

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN CICADÉLIDOS VECTORES POTENCIALES DE
Xylella fastidiosa Wells et al. QUE SE ALIMENTAN DEL TEJIDO VASCULAR DE
PLANTAS DE CAFÉ *Coffea arabica* L. EN TRES LOCALIDADES DE PUERTO RICO.

Por

Yobana Andrea Mariño Cárdenas

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
Protección de Cultivos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobado por:

Ángel L. González, PhD
Miembro Comité Graduado

Fecha

Edwin Abreu, M.S.
Miembro Comité Graduado

Fecha

Mildred Zapata, PhD
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Wigmar González, M.S.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Arístides Armstrong, M.S.
Director de Departamento

Fecha

© *Yobana Andrea Mariño Cardenas, 2007*

ABSTRACT

Xylella fastidiosa (Xf) is a xylem-limited bacterium that is the causal agent of coffee leaf scorch (CLS) in Central America and citrus variegated chlorosis (CVC) in South America. The purpose of this research was to investigate potential vectors of Xf in plantings of coffee, *Coffea arabica* L., assess bacteria carried in the head and body of these insects and to identify bacteria present in coffee plants in Puerto Rico. A survey was conducted from June to November 2006 at four farms, two located in Yauco, one in Juana Díaz and one in Adjuntas. Insects were collected at each site at 15 day intervals; 7,423 individuals were collected belonging to five families and twelve species. Cicadellidae was the primary family in both the number of species and individuals. Indices of dominance, abundance, frequency and constancy showed *Agallia pulchra*, *Apogonalia* spp., *Caribovia coffeacola* and *Hortensia similis* to be the most important species and potential vectors. Indices also showed significant differences between locations with higher diversity and equity at Yauco farms, and higher dominance in Adjuntas. Species similarity was greatest between Juana Diaz and Villa Cecilia (Yauco) farms.

Bacteria from head and body tissues of three insect species were isolated in periwinkle wilt (PW) medium and were characterized by fatty-acid methyl ester into 19 genera. These genera were divided into four groups according to insect treatment and tissue. *Curtobacterium*, *Micrococcus* and *Pasteurella* were identified only in the head; *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Rhizobium* and *Vibrio* were identified as bacteria from internal tissues. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Kluyvera*, *Kokuria*, *Nocardia*, *Pectobacterium* and *Pseudomonas* were identified in the external tissues. Finally, *Bacillus* and *Microbacterium* were isolated in all tissues. The only genus previously reported antagonistic to Xf is *Curtobacterium* which was isolated from *Hortensia similis*.

Bacteria from coffee plants were isolated in PW. These isolates were characterized by BIOLOG® into nine genera. The dominant were: *Bacillus*, *Micrococcus* and *Staphylococcus*. In fewer proportions were: *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium* and *Sphingobacterium*. Bacteria common in both insects and plants were: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter* and *Micrococcus*.

All Gram negative bacteria were tested to detect the presence of Xf by the ELISA test. Four isolates from *C. coffeacola* and *H. similis* were positive to Xf using ELISA but it was not possible to isolate the bacterium in PW for final confirmation.

RESUMEN

Xylella fastidiosa (Xf) es una bacteria limitante del xilema y es el agente causal de la enfermedad conocida como el encorchado de la hoja del café (CLS) en América central y la clorosis variegada de los cítricos en Sur América. Esta investigación se realizó con el fin de auscultar la presencia de insectos vectores potenciales de Xf en plantaciones de café *Coffea arabica* L., determinar las bacterias que éstos portan en la cabeza y cuerpo e identificar bacterias presentes en plantas de café en Puerto Rico. Los catastros de insectos se realizaron durante junio a noviembre de 2006, en cuatro fincas, dos en Yauco, una en Juana Díaz y una en Adjuntas. La colección de insectos para cada sitio se realizó cada 15 días. Se colectó un total de 7,423 insectos distribuidos en 5 familias y 12 especies. La familia Cicadellidae fue la principal en número de especies e individuos. Los índices de constancia, frecuencia, abundancia y dominancia, determinaron como especies predominantes y vectores potenciales a: *Agallia pulchra*, *Apogonalia* spp., *Caribovia coffeacola* y *Hortensia similis* (dominante en la vegetación rastrera). Los índices de diversidad mostraron diferencias significativas entre localidades con mayores valores de diversidad y equidad en las fincas de Yauco y alta dominancia en Adjuntas. La mayor similitud de especies se obtuvo al comparar las fincas de Juana Díaz y Villa Cecilia.

Se aislaron bacterias en el medio de cultivo ‘periwinkle wilt’ PW de la cabeza y el cuerpo de las tres especies reportadas como vectores potenciales. Estas se caracterizaron mediante ácidos grasos en 19 géneros, los cuales se dividieron en cuatro grupos de acuerdo al tejido del insecto y tratamiento. Los géneros *Curtobacterium*, *Micrococcus* y *Pasteurella* se identificaron en la cabeza. *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Rhizobium* y *Vibrio* se detectaron en los tejidos internos. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Kluyvera*, *Kokuria*, *Nocardia*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas* se identificaron en tejidos externos. *Bacillus* y *Microbacterium*, se aislaron en todos los tejidos. De estos géneros el único que ha sido informado asociado antagónicamente con Xf es *Curtobacterium*, aislada de tejidos de *H. similis*.

Se aislaron bacterias de plantas de café en PW. Estas se identificaron en nueve géneros mediante el sistema BIOLOG®. Los géneros dominantes fueron: *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. En menor proporción: *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium* y *Sphingobacterium*. Los géneros comunes en insectos y plantas fueron: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Micrococcus* y *Rhizobium*.

Todas las bacterias Gram negativas se evaluaron para detectar la presencia de Xf por la prueba de ELISA. Se detectó Xf en cuatro aislamientos provenientes de *C. coffeacola* y *H. similis* mediante la prueba de ELISA pero no se logró aislar la bacteria en PW para su confirmación final.

Dedico:

A mi mamita Luz Alba, a la memoria de mi padre Marco Antonio, a mis hermanos Patricia, Marina, William, Alicia y Claudia, a mi cuñado Guillermo y mis sobrinos, por confiar en mi y ser la fuerza que me motiva a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto ZTS-16 “Estudio de *Xylella fastidiosa* y de insectos vectores en Puerto Rico” de la Estación Experimental Agrícola, por su patrocinio para la realización de ésta investigación.

A la Dra. Mildred Zapata por haberme permitido trabajar bajo su orientación, apoyo y consejo.

Al Doctor Ángel González y al profesor Edwin Abreu por sus sugerencias y recomendaciones

Al MSc. Wigmar González por ser el Representante de Estudios Graduados y su colaboración durante la fase de campo.

A los Doctores Brent Brodbeck y Stuar McKamey por su apoyo en la identificación de los insectos.

A los agrónomos María Maldonado, Esau Orengo e Ivelisse Ruíz, por su colaboración en la identificación de los sitios de muestreo.

A los agricultores por haberme permitido el acceso a sus predios para realizar los muestreos.

Al personal de la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas. por su ayuda en todo momento.

A Rosario Gaud, Alvaro Serrano, Diego Viteri y Manuel Santana por su colaboración en la fase de campo.

A Miguel Arango por sus aportes en el análisis de los datos, su compañía y amistad.

A Neis Martínez por su valioso aporte en el manejo de los datos.

A Ana María Sánchez por todo su apoyo, amistad, compañía y consejos durante el tiempo que nos hemos conocido.

A Zamira Yousseff por su ayuda en la identificación de los insectos.

Al Doctor Nico Franz por permitirme acceder a la colección de insectos del Departamento de Biología del RUM-UPRM

A mis amigos por estar ahí cuando más los necesito.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-------------|
| ABSTRACT | III |
| RESUMEN | IV |
| AGRADECIMIENTOS | VI |
| TABLA DE CONTENIDO | VII |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE TABLAS | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 3. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 3.1 Origen, generalidades e importancia del café en Puerto Rico | 4 |
| 3.2 Enfermedades bacterianas del café | 5 |
| 3.2.1 Crespera del café | 5 |
| 3.2.2 Quemazón bacteriana de las hojas | 7 |
| 3.2.3 Mancha foliar de la punta de la hoja | 8 |
| 3.2.4 Plaga bacteriana del café ‘Bacterial blight coffee’ | 9 |
| 3.3 Bacterias endofíticas en plantas de café <i>Coffea arabica</i> L. | 10 |
| 3.4 Bacterias endófitas en insectos vectores de <i>X. fastidiosa</i> | 11 |
| 3.5 Generalidades de <i>X. fastidiosa</i> | 12 |
| 3.5.1 Descripción de la especie | 13 |
| 3.5.2 Relación de <i>X. fastidiosa</i> con bacterias endófitas | 13 |
| 3.6 Distribución de <i>X. fastidiosa</i> | 14 |
| 3.7 Mecanismo de transmisión de <i>X. fastidiosa</i> por los insectos vectores | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8 Mecanismo de acción de la bacteria | 16 |
| 3. 9 Características de los insectos vectores | 17 |
| 3.10 Rango de vectores | 18 |
| 3.11 Características de 2 especies vectores reportadas para Puerto Rico | 21 |
| 3. 11.1 <i>Hortensia similis</i> Walker | 21 |
| 3. 11. 2 <i>Leocomiapsis scaramuzzai</i> Metcalf & Bruner. | 22 |
| 3. 12 Rango de hospederos | 22 |
| 3.13 Métodos de muestreo para monitorear insectos (Hemiptera: Cicadellidae) | 24 |
| 3.14 Índices de biodiversidad | 25 |
| 3.14 Métodos de aislamiento y detección de <i>X. fastidiosa</i> | 26 |
| 3.14.1 Crecimiento en medios de cultivo | 26 |
| 3.14. 2 Prueba de ELISA | 26 |
| 3. 14.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 27 |
| 3. 15 Identificación de desconocidos bacterianos mediante análisis de ácidos grasos | 28 |
| 3. 16 Identificación de desconocidos bacterianos mediante sistema BIOLOG® | 29 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 4.1 Catastro de insectos vectores y/o vectores potenciales de <i>X. fastidiosa</i> en cuatro fincas de café tres en localidades de Puerto Rico. | 31 |
| 4.1.1. Localización y caracterización del área de estudio | 31 |
| 4.1.2 Métodos de colección | 33 |
| 4.1.3 Identificación de los insectos | 34 |
| 4.1.4 Análisis de datos | 35 |
| 4.2 Muestreo, caracterización morfológica y bioquímica de colonias bacterianas presentes en la cabeza y cuerpo, desinfestado y sin desinfestar de tres insectos. | 41 |
| 4.2.1 Colección de Muestras | 41 |
| 4.2.2 Aislamiento de bacterias | 41 |
| 4.2.3 Caracterización de bacterias | 43 |
| 4.2.4 Identificación mediante el análisis de ácidos grasos (CG-FAME) | 43 |
| 4.2.4 Detección de <i>X. fastidiosa</i> por el método ELISA-DAS en los desconocidos bacterianos Gram negativos. | 44 |
| 4.3 Aislamiento y purificación de bacterias de tejidos vegetales | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Identificación mediante el sistema BIOLOG® de desconocidos bacterianos obtenidos de hojas de café. | 47 |
| 5. RESULTADOS | 48 |
| 5.1 Composición y riqueza de insectos vectores potenciales de <i>X. fastidiosa</i> en cuatro fincas de tres localidades de Puerto Rico. | 48 |
| 5.2 Caracterización de la comunidad de Hemiptera; suborden Auchenorrhyncha | 51 |
| 5.2.1 Finca localizada en Adjuntas, carretera 526 – Km 6.6 | 51 |
| 5.2.2 Finca localizada en Juana Díaz. Barrio Coyores. Carretera 517 | 54 |
| 5.2.3 Finca localizada en Yauco. Villa Cecilia, Carretera 372 | 57 |
| 5.2.3 Finca localizada en Yauco. Sierra Alta, Carretera 375 | 60 |
| 5.3 Índices de biodiversidad | 63 |
| 5.3.1 Biodiversidad α (diversidad de Shanon, Equidad y Dominancia) | 63 |
| 5.3.2 Índices de biodiversidad β (Similaridad de Bray-Curtis). | 64 |
| 5.4 Muestreo, caracterización morfológica y quimiotaxónomica de colonias bacterianas presentes en las tres especies de insectos . | 65 |
| 5.5 Identificación de desconocidos bacterianos provenientes de tejidos de insectos; mediante análisis de ácidos grasos (CG-FAME) | 69 |
| 5.5.1 Análisis estadístico | 73 |
| 5.7 Prueba con ELISA | 75 |
| 5.8 Muestreo, caracterización morfológica y quimiotaxónomica de colonias bacterianas presentes en café. | 76 |
| 5.9 Identificación de desconocidos bacterianos obtenidos de café. | 81 |
| 5.8.1 Distribución de géneros bacterianos por finca de muestreo | 82 |
| 5.9 Géneros bacterianos comunes en tejidos de insectos y plantas. | 83 |
| 6. DISCUSIÓN | 85 |
| 6.1 Composición y riqueza de insectos en cuatro fincas de café de tres localidades de Puerto Rico. | 85 |
| 6.2 Índices de biodiversidad | 90 |
| 6.3 Diversidad bacteriana presente en tres especies de insectos vectores. | 91 |

| | |
|---|------------|
| 6.4 Determinación de la presencia de <i>X. fastidiosa</i> mediante la prueba de ELISA. | 101 |
| 6.5 Diversidad bacteriana presente en los tejidos internos de café. | 102 |
| 6.6 Comparación de la diversidad bacteriana observada en los tejidos de insectos y los tejidos internos de café. | 106 |
| 6.7 Consideraciones relacionadas a los métodos empleados para la detección de <i>X. fastidiosa</i>. | 107 |
| 7. CONCLUSIONES | 109 |
| 8. RECOMENDACIONES | 111 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 113 |
| ANEXOS | 127 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Métodos utilizados para la captura de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) (A) Trampas Amarillas con pega, (B) Red entomológica..... | 34 |
| Figura 2. Riqueza y abundancia de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en las fincas de café. | 48 |
| Figura 3. Especies de insectos (Hemiptera:Auchenorrhyncha) colectados en fincas de café. Cicadellidae (A-H), Cixiidae (I), Membracidae (J), Achilidae (K), Tropiduchidae (L). | 50 |
| Figura 4. Frecuencia relativa de las especies (Hemiptera:Auchenorrhyncha) en las cuatro fincas de café. | 51 |
| Figura 5. Variación temporal de la riqueza y abundancia de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en la finca de Adjuntas..... | 52 |
| Figura 6. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha), colectados en la finca de Adjuntas durante junio a noviembre de 2006. Familias (A), Especies (B)..... | 54 |
| Figura 7. Variación temporal de la riqueza y abundancia de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha), en la finca de Juana Díaz. | 55 |
| Figura 8. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Juana Díaz durante junio a noviembre de 2006. Familias (A), Especies (B)..... | 57 |
| Figura 9. Variación temporal de la riqueza y abundancia de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Villa Cecilia). | 58 |
| Figura 10. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Villa Cecilia) durante junio a noviembre de 2006. Familias (A), Especies (B).. | 60 |
| Figura 11. Variación temporal de la riqueza y abundancia de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Sierra Alta)..... | 61 |
| Figura 12. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Sierra Alta) durante junio a noviembre de 2006. Familias (A) , Especies (B).... | 63 |
| Figura 13. Distribución del número total de colonias de bacterias aisladas de tres especies de insectos por tejido y tratamiento. | 65 |
| Figura 14. Frecuencia relativa de bacterias Gram negativas agrupadas por su respuesta bioquímica aisladas de tres especies de insectos. | 68 |
| Figura 15. Frecuencia relativa de bacterias Gram positivas agrupadas por su respuesta bioquímica aisladas de tres especies de insectos. | 68 |
| Figura 16. Frecuencia relativa de géneros bacterianos identificados mediante CG-FAME; aislados de tejidos de tres especies de insectos..... | 70 |
| Figura 17. Dendograma generado con los géneros bacterianos aislados de tres especies de insectos, agrupados por origen de aislamiento. | 73 |
| Figura 18. Distribución de bacterias aisladas de café agrupadas por lugar de muestreo y respuesta Gram | 77 |
| Figura 19. Frecuencia relativa de bacterias Gram negativas de café agrupadas por su respuesta bioquímica..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Figura 20. Frecuencia relativa de bacterias Gram positivas de café agrupadas por su respuesta bioquímica..... | 79 |
| Figura 21. Frecuencia relativa de géneros bacterianos aislados de café según el sistema BIOLOG®. | 81 |
| Figura 22. Frecuencia relativa de géneros bacterianos aislados de café..... | 83 |

LISTA DE TABLAS

| Tablas | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Especies de insectos vectores de la bacteria <i>Xylella fastidiosa</i> | 19 |
| Tabla 2. Frecuencia y número total de colectas realizado sobre plantas de café, <i>Coffea arabica</i> en cuatro fincas, durante junio a noviembre de 2006. | 34 |
| Tabla 3. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados Finca de Adjuntas durante junio a noviembre de 2006. | 53 |
| Tabla 4. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Juana Díaz durante junio a noviembre 2006. | 56 |
| Tabla 5. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Villa Cecilia) durante junio a noviembre 2006. | 59 |
| Tabla 6. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Sierra Alta) durante junio a noviembre 2006. | 62 |
| Tabla 7. Total de individuos, riqueza, diversidad (H'), equidad (J') y dominancia (D) de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en cuatro fincas de café, durante junio a noviembre de 2006. | 64 |
| Tabla 8. Índice de biodiversidad β de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de cuatro fincas de café durante junio a noviembre de 2006. | 64 |
| Tabla 9. Número total de colonias bacterianas por especie de insecto, tejido de aislamiento y tratamiento. | 66 |
| Tabla 10. Número total de aislamientos bacterianos aislados de insectos agrupados por especie de insecto, tejido de aislamiento y respuesta a la tinción diferencial Gram. | 66 |
| Tabla 11. Número total de cepas agrupadas por origen de insecto, tejido de aislamiento y respuesta quimiotaxónomica. | 67 |
| Tabla 12. Morfología celular de bacterias aisladas de tres especies de insectos. | 69 |
| Tabla 13. Aislamientos bacterianos de diferentes tejidos de tres especies de insectos identificados por medio del análisis de ácidos grasos. | 71 |
| Tabla 14. Distribución por tejido y tratamiento de las bacterias predominantes aisladas de tres especies de insectos. | 72 |
| Tabla 15. Conglomerados generados mediante el algoritmo de encadenamiento completo 74 | 74 |
| Tabla 16. Características e identificación mediante (CG-FAME) de cuatro aislamientos considerados de forma preliminar como positivos mediante la prueba de ELISA. | 76 |
| Tabla 17. Número total de bacterias por localidad y respuesta quimiotaxónomica. | 78 |
| Tabla 18. Morfología celular de bacterias aisladas de plantas de café. | 80 |
| Tabla 19. Comparación de diversidad bacteriana en tejidos de insectos y plantas. | 84 |

1. INTRODUCCIÓN

Los insectos conocidos como saltahojas son comunes y abundantes en los ambientes tropicales y subtropicales, donde juegan roles ecológicos importantes en los ecosistemas (Redak et al., 2004). Existen relativamente pocas especies de saltahojas que se alimentan de los fluidos del xilema (Homoptera: Cicadellidae, tribus Cicadellini y Proconiini) (Raven, 1984 citado por: Redak et al., 2004). De acuerdo con Purcell y Hopkins (1996), los saltahojas son considerados plagas importantes en la agricultura comercial, debido a que transmiten bacterias patógenas de plantas, ejemplo: *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) y *Pseudomonas syzygii*.

Estas dos especies bacterianas son definidas como organismos endófitos parásitos que viven exclusivamente en las células del xilema. Usualmente son descritas como bacterias patógenas de tipo fastidioso (Purcell y Hopkins, 1996). La bacteria *P. syzygii* es el agente causal de la enfermedad conocida como Sumatra de los clavos ‘Sumatra disease clove’. Ésta bacteria, también puede tener un amplio rango de hospederos. (Roberts et al., 1990; Lomer et al., 1992).

La bacteria *X. fastidiosa* es responsable de pérdidas económicas en muchos cultivos agrícolas. También puede vivir en hospederos sin síntomas, que sirven de fuentes de inóculo (Purcell y Hopkins, 1996; Newman et al., 2003). Los reportes de la bacteria ocasionando enfermedades en plantas son: Hopkins (1989); Purcell y Hopkins, (1996) citados por: Hill y Purcell (1997); Hopkins (1989); Hopkins y Purcell (2002); Purcell (1979); Purcell (1989) citados por: Redak et al. (2004); Mizell et al., (2003). Los estudios

reportan que *X. fastidiosa* afecta cultivos tales como la vid, cítricos, café, almendra, alfalfa, melocotón, ciruela, pera, ornamentales, árboles forestales y otras plantas. No existe ningún tipo de control para la bacteria. Blake et al. (2004) encontraron que la bacteria se mueve y se multiplica en los tejidos conductores del xilema, impidiendo el movimiento de agua y minerales, taponando los tejidos y causando en algunos casos la muerte de las plantas.

Excepto por los reportes de la quemazón de la hoja de pera en Taiwán (Leu, 1993) y la enfermedad de Pierce's en Yugoslavia (Berisha et al., 1998), las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* están restringidas al continente americano. Los ambientes tropicales y subtropicales favorecen el desarrollo de la enfermedad (Redak et al., 2004).

El conocimiento acerca de los vectores de la bacteria es relativamente poco y está derivado de estudios hechos en Norte América (Redak et al., 2004). En Puerto Rico, se ha detectado la presencia de algunos de los vectores potenciales de la bacteria (Brodbeck y Andersen, 2006; Brodbeck et al., 2006) tales como *Hortensia similis* Walker, *Caribovia coffeacola* (Dozier) y *Leocomiapsis scaramuzzai* Metcalf & Bruner.

La importancia del estudio radica en el alto potencial agrícola que representa para Puerto Rico el cultivo de café. Según el censo de 1998 del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (citado por Rodríguez, 2000), el café es uno de los sectores dominantes de la agricultura puertorriqueña. Constituyéndose en el segundo cultivo de importancia social, económica y ecológica de la zona montañosa. La producción de café promedio para el año 2004-05 fue de 8750 toneladas con un valor de \$ 33.8 millones en un área de 22794 hectáreas (Departamento de Agricultura de Puerto

Rico, 2005). El propósito de ésta investigación es proveer información sobre insectos con potencial de ser vectores de *X. fastidiosa* en plantaciones de café, establecer bacterias que prevalecen en la cabeza y cuerpo de: *H. similis* Walker, *C. coffeacola* (Dozier) y *Apogonalia* spp y brindar una descripción de la diversidad bacteriana presente en el tejido vascular de las plantas de café.

2. OBJETIVOS

Identificar y describir aspectos ecológicos de insectos con hábito de alimentación del sistema vascular, principalmente aquellos reportados como vectores de *X. fastidiosa* en plantas de café en cuatro fincas de tres localidades de Puerto Rico.

Aislar, caracterizar e identificar poblaciones bacterianas presentes en la cabeza y cuerpo de tres especies de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa*: *H. similis* (Walter), *C. coffeacola* (Dozier) y *Apogonalia* spp.

Aislar caracterizar e identificar las poblaciones bacterianas presentes a nivel vascular de plantas de café en cuatro fincas de tres localidades de Puerto Rico.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Origen, generalidades e importancia del café en Puerto Rico

El café pertenece a la familia Rubiaceae y en el género *Coffea*, se conocen varias especies, pero sólo tres de ellas son usadas en la producción comercial: *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica*. Las plantas de la especie *C. arabica* se cultivan a altitudes que varían entre los 1000 a 2000 metros sobre el nivel del mar en regiones ecuatoriales y entre 400 a 1200 metros en regiones lejanas al ecuador (9 – 24 ° de latitud N y S), donde las temperaturas diarias fluctúan entre los 18 – 22 ° C. Mientras que las de la especie *C. canephora* requieren climas calientes y húmedos en tierras bajas y colinas tropicales, se distribuyen mayormente entre las latitudes de 10° N y 10° S, en altitudes que van desde los 100 – 1000 m, con temperaturas promedio diarias de 22 – 26 ° C (Anzueto et al., 2005).

La especie *C. arabica* es un arbusto nativo de las tierras altas del sudoeste de Etiopia, de la meseta de Boma en Suda y del Monte de Marsabit en Kenia. Ha sido cultivado en Yemen por lo menos desde hace cinco siglos, y difundido al sudeste de Asia alrededor del año 1700. Poco después las semillas de la única planta cultivada en Ámsterdam y Paris fueron enviadas a América Latina. Otras introducciones siguieron más tarde en el siglo XVIII de Yemen a Brasil, a través de la Isla de Borbón. Estas dos introducciones dieron origen a muchos cultivares y fueron descritas como dos distintas variedades, comúnmente conocidas como Typica y Borbón (Anthony et al., 2003). En Puerto Rico, fue introducido directamente de Arabia, la especie *C. arabica* var. Typica, en el año de 1736 (Departamento de Agricultura y Comercio, 1942; Monroig, 2007). Sin embargo, en la isla las variedades más cultivadas son Caturra que es una

mutación del Borbón, Limaní (cruce entre Villa Carchi e híbrido de Timor) y Robusta (variedad de la especie *canephora*) (Anzueto et al., 2005).

El café constituye para Puerto Rico el cultivo agrícola de mayor importancia social, económica, ecológica e hidrográfica de la zona montañosa (Monroig, 2007). La zona cafetalera se encuentra localizada en la parte oeste central del la isla, incluye los municipios de Adjuntas, Lares, Utuado, Jayuya, Orocovis, San Sebastián, Ciales, Yauco, Las Marías, Maricao, San Germán, Ponce, Mayagüez, Guayanilla, Peñuelas, Coamo, Moca, Añasco, Aguada (United States Department of Agriculture, 2002). La producción de café para el año 2004-05 fue de 8750 toneladas, cultivadas en un área de 22,794 Ha, para un valor de cosecha de \$ 33.8 millones (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2005)

3.2 Enfermedades bacterianas del café

3.2.1 Crespera del café

El agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Xylella fastidiosa* Wells et al. El primer informe de infección de ésta bacteria en café fue realizado en 1995 por Beretta, en el estado de S. Paulo en Brasil. Se encontró asociada con la presencia de raquitismo, muerte descendente y quema del borde de las hojas en las plantas del café. El agente causal de la enfermedad ha sido detectado mediante métodos moleculares y serológicos (Vargas et al., 2002; Rodríguez, 2003). Posteriormente, material de café y cítricos con síntomas de la enfermedad fueron diagnosticadas como infectadas por *X. fastidiosa* en Brasil, Francia y los Estados Unidos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (CICAFE, 2000 citado por: Rodríguez, 2003).

La bacteria hasta ahora ha sido reportada ocasionando ataques severos en cultivos de café en Costa Rica y Brasil, donde se ha presentado una alta incidencia de ésta. La raza de *X. fastidiosa* que se ha considerado capaz de infectar plantas de café, es transmitida por el saltahoja *Dilobopterus costalimai* (Cicadellidae: Cicadellinae) (Leite et al., 1999 citado por: Céu et al., 2006; Li et al., 2001).

Los síntomas que se manifiestan morfológicamente en la planta, varían desde hojas alargadas y estrechas con márgenes ondulados y necrosados, la necrosis avanzada la cual termina secando completamente las hojas, entrenudos cortos, formación de grupos de hojas terminales. De igual manera, las inflorescencias se tornan de color verdoso, hay una reducción del tamaño y cantidad de frutos, bajando la producción significativamente. Cuando la enfermedad está avanzada se observa un alto grado de defoliación, debilitamiento general y en algunos casos la muerte del árbol. Así mismo, una misma planta puede presentar ramas con síntomas severos y ramas aparentemente sin síntomas. En aquellas ramas con síntomas se observa un oscurecimiento del xilema (Li et al., 2001; Vargas et al., 2002).

En términos de resistencia a la infección, no se ha logrado determinar ningún nivel en las especies del género *Coffea*. En ensayos de respuesta a la infección las especies *C. kapakata*, *C. canephora*, *C. racemosa*, *C. arabica*, *C. dewevrei*, *C. stenophylla*, y *C. eugenoides* y los híbridos *C. arabica* var. *dewyri*, *C. arabica* var. *euglenoides*, *C. arabica* var. *racemosa* y *C. canephora* var. *robusta*, tienen alta susceptibilidad a la enfermedad (Rodríguez, 2003).

3.2.2 Quemazón bacteriana de las hojas

Los síntomas de manchas necróticas en las hojas de café han sido atribuidas a la bacteria *Pseudomonas cichorii* (Swingle), la cual aparece primero como una fase epífita en la superficie foliar, penetrando normalmente a través de las lesiones ocasionadas por hongos (*Cercospora* y *Phoma*) y el insecto minador *Leucoptera coffeella* (Kimura, 1976 citado por Sánchez et al., 2003).

La bacteria *P. cichorii* fue descrita por Swingle, 1925; ésta bacteria posee células flageladas, produce pigmentos fluorescentes, es oxidasa positiva y utiliza la glucosa como su primera fuente de carbohidrato para el metabolismo (Krieg y Holt, 1984). Es una especie que tiene un amplio rango de hospederos. Ha sido reportada como patógeno de lechuga (*Lactuca sativa*), magnolia (*Magnolia grandiflora*), trébol (*Trifolium pratense*), coliflor (*Brassica oleraceae*), calabaza (*Cucurbita pepo*), en las cuales ocasiona enfermedades foliares (Balows et al., 1992).

Sánchez et al. (2003), aislaron 17 cepas patógenicas de *P. cichorii* provenientes de plantas de café, en viveros de ocho municipios de Puerto Rico. Ellos probaron la patogenicidad de éstas sobre hojas jóvenes y adultas de las plantas; encontrándose que la bacteria es más virulenta sobre las hojas adultas, lo que indica la resistencia de la planta al patógeno varía con la edad fisiológica. Así mismo, en cuanto a la susceptibilidad de las variedades de café comerciales evaluadas, se encontró que las variedades de *C. arabica* Borbón, Pacas y Caturra fueron susceptibles; mientras que las especies *C. liberica* var. Excelsa y *C. canephora* var. Robusta fueron resistentes.

3.2.3 Mancha foliar de la punta de la hoja

La enfermedad ha sido reportada en África (Baker, 1972; Ramos, 1976; Okioga, 1977 citados por: Sánchez et al., 2003). De igual manera ellos han reportado previamente a la enfermedad como epidémica, ya que ha causado pérdidas de un 30 a 70% en plantas en parcelas sin tratamiento. En otros países tales como Brasil (Franco, 1958; Ramos, 1976 citados por: Sánchez et al., 2003), han informado a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas garcae* causando síntomas similares.

Es particularmente importante en plántulas de viveros, donde ocasiona síntomas similares a la antracnosis, lo que dificulta su diagnóstico en campo (Sánchez et al., 2003). El primer reporte del patógeno para Puerto Rico fue realizado por Cortés, (1988); quien la detectó en la localidad de Adjuntas, dado sus síntomas fue descrita como mancha foliar de la punta de las hojas, además de las lesiones necróticas de color castaño. De los tejidos afectados se aisló un bacilo Gram negativo, el organismo perteneciente al género *Pseudomonas* produjo pigmentos fluorescentes en el medio King's, fue catalasa positivo (aeróbico), dihidrolasa negativa, utiliza la sucrosa y el manitol. Este organismo aislado fue inoculado nuevamente en plantas en invernadero donde los síntomas similares a los iniciales fueron observados a partir de los cinco días de inoculación. De igual manera se ha reportado a *P. syringae* pv. *syringae* en otras especies de plantas ocasionando síntomas similares (Bergey et al., 1974 citados por: Cortés, 1988).

P. syringae se diferencia de *P. cichorii* en su respuesta a la reacción de oxidasa, *P. syringae* en oxidasa negativa (Balows et al., 1992).

3.2.4 Plaga bacteriana del café ‘Bacterial blight coffee’

La enfermedad fue descrita por Amaral et al., 1956. Desde entonces ha sido reportada en Brasil, Kenia, Uganda y China, países donde ha tomado importancia debido a su alta incidencia y severidad (Wen y Chen, 1995; Chen, 2002 citados por: Céu et al., 2006). Es conocida como “halo blight of coffee” por su nombre en inglés la cual es ocasionada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, ésta infecta las hojas, ramas apicales y frutos jóvenes ocasionando lesiones necróticas oscuras e irregulares, las cuales en primera instancia se asocian al hongo *Phoma* sp. Sin embargo, éstas se pueden distinguir por la presencia de exudados bacterianos en las lesiones jóvenes. En condiciones desfavorables para su multiplicación, la bacteria persiste en gran cantidad, sobre partes sanas de la planta, pero durante las épocas frescas es cuando se multiplica e inician las epidemias (Céu et al., 2006).

En Brasil y Kenia, se han reportado dos razas de la bacteria ocasionando daños severos. Los síntomas de la enfermedad en Brasil fueron observados como una severa defoliación, en las hojas se observan puntos de color café rodeados de un halo amarillento (Cortés, 1988). Mientras que en Kenia es caracterizada por una muerte descendente de las ramas suculentas, esta muerte se origina de una necrosis angular oscura de brotes apicales, nudos y en algunos casos en la base de las hojas cerca del pecíolo. Las lesiones tienen una rápida propagación en los márgenes húmedos de las hojas. En estados avanzados se pueden observar canchales sobre ramas leñosas y el tallo principal, estos canchales pueden alcanzar el sistema vascular, resultando en marchitez y desecación de las ramas de la planta (Kairu, 1996).

Kairu (1996); inoculó plántulas de café *C. arabica* con aislamientos de las especies bacterianas *P. syringae* pv. *syringae* y *P. syringae* pv. *garcae*, notó que en aquellas inoculadas

con el pv. *garcae* los meristemos apicales y las hojas desarrollaron lesiones húmedas en el margen después de 4-5 días de inoculación. Estos se tornaron necróticos a partir del día siete. Mientras que para las inoculadas con el pv. *syringae* se observaron zonas necróticas después de los 4 – 5 días de inoculación sin lesiones húmedas. Estos dos patovares no solo se diferencian por sus síntomas primarios, ellos también difieren en otras características bioquímicas y patogénicas. De igual manera, él evaluó la patogenicidad de aislamientos de *P. syringae* pv. *garcae* provenientes de Kenia y Brasil, pero no registró ningún tipo de síntoma (lesiones húmedas o necrosis) para todas aquellas plántulas inoculadas con el proveniente de Brasil, a pesar que el periodo de incubación se prolongó a cuatro semanas. Se concluyó de forma preliminar que la patogenicidad se debe a la capacidad de producir pigmentos fluorescentes dado que esta fue la única diferencia observada entre estos dos.

3.3 Bacterias endofíticas en plantas de café *Coffea arabica* L.

De acuerdo con Lima et al. (2005); las bacterias endófitas comprenden principalmente microorganismos que colonizan el tejido interno de las plantas, después pueden vivir en el hospedero en una manera simbiótica. Así mismo, varias funciones ecológicas han sido asignados a estos organismos tales como, antibiósis a agentes patógenos y promover el crecimiento de las plantas. Se ha observado que estos organismos endofitos no causan daño visible en el tejido de la planta, pero pueden ser aisladas de tejido desinfectado de la planta o de sus partes internas. Sin embargo, ellos colonizan nichos ecológicos similares a los de organismos fitopatógenos, por lo que algunas especies podrían ser usados en control biológico, acelerar la emergencia de las

plántulas, promover su establecimiento bajo condiciones adversas y aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Araújo et al., 2002).

Vega et al., (2005) reportaron 87 aislamientos bacterianos endofitos distribuidos en 19 géneros, obtenidos a partir de plantas de café colectadas en Colombia, Hawaii y México. Las bacterias fueron aisladas a partir de hojas adultas de las plantas, varias partes del fruto (cereza), hojas, tallos y raíces. Dentro de los géneros que ellos reportan se incluyen *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomas*. Aún es desconocido el papel de estas bacterias endofíticas en la biología de las plantas de café.

3.4 Bacterias endófitas en insectos vectores de *X. fastidiosa*

Santos et al. (2004) colectaron insectos vectores de *X. fastidiosa* en fincas de plantaciones de cítricos en Brasil, donde se había reportado la enfermedad. A partir de la cabeza de cuatro especies de insectos (*Acrogonia* sp., *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis* y *Bucephalagonia xanthophis*). Este estudio logró aislar 120 bacterias, las cuales fueron divididas en 40 holotipos. Algunos halotipos identificados mediante secuenciamiento de la región 16S e identificados como: *Sphingomonas asaccharolytica*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Curtobacterium* sp. y *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Para demostrar la capacidad de adquisición de bacterias endófitas por parte de los insectos, Santos y sus colaboradores, tomaron un aislamiento de la especie *M. mesophilicum*, el insecto *Bucephalagonia xanthophis* y la planta modelo *Catharantus*, para sus experimentos. Finalmente, lograron demostrar que los insectos transmitieron la bacteria desde la membrana de

las plantas con una frecuencia de 13.33%. De acuerdo con estos resultados ellos concluyen que las bacterias endofíticas presentes en cítricos están presentes en los insectos, en gran diversidad, lo que sugiere que éstos pueden adquirir las bacterias de las plantas y estas pueden estar relacionadas con el equilibrio del sistema.

De acuerdo con Purcell (datos sin publicar citado por Redak et al., 2004), el intestino posterior y medio de insectos tales como los saltahojas normalmente contiene una gran variedad de bacterias. Así mismo, es menos común observar la presencia de otras bacterias en el intestino anterior según se ha determinado por microscopio (Severin, 1979; Brlansky et al., 1983 citados por Redak et al. 2004); o cultivo (Hill y Purcell, 1995a), lo que implica que la bacteria requiere adaptaciones especiales para habitar en el intestino anterior.

3.5 Generalidades de *X. fastidiosa*

La bacteria del género *Xylella* pertenece a la división Gracilicutes, subdivisión Proteobacteria, son difíciles de crecer en medios de cultivo (Mizell et al., 2003) y se limitan al xilema en las plantas. Pooler et al. (1997) reportan esta bacteria como agente causal de muchas enfermedades de importancia económica, entre las que se incluyen: la enfermedad de Pierce's en la vid (Davis et al., 1978); el enanismo de la alfalfa (Goheen et al., 1973); la falsa enfermedad del melocotón (Wells et al., 1983); la marchitez de la playera (McCoy et al., 1978); la quemazón de la hoja en la ciruela (Raju et al., 1982), pera (Leu y Su, 1993), almendra (Mircetich et al., 1976), olmo, sicomoro y roble (Hearon et al., 1980); la clorosis variegada de los cítricos (CVC) (Chang et al., 1993; Hartung et al., 1994); así como la quemazón de las hojas en el café (Mizell

et al., 2003) y otras plantas (Hopkins, 1989 y Wells et al., 1989 citados por: Hill y Purcell, 1995b).

3.5.1 Descripción de la especie

Xylella fastidiosa es la única especie del género descrita por Wells et al.,(1987). Estudios de DNA y al análisis de las secuencias 16S y 23S han permitido considerar la presencia de tres subespecies, *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, *X. fastidiosa* subsp *multiplex* y *X. fastidiosa* subsp.*pauca* (Schaad et al., 2004). La bacteria reside en los vasos del xilema de las plantas hospederas, tiene un ámbito de temperatura óptima entre 26 y 28°C y un pH óptimo para crecimiento de 6.5 a 6.9 (Rodríguez, 2005). Corresponde a un organismo Gram-negativo, posee forma de bastón con ondas distintivas en la pared celular, sin flagelo y sin esporas y generalmente miden 0.1 – 0.5 µm por 1 - 5 µm (Bradbury, 1991), se reproduce asexualmente por fisión binaria (Cambell et al., 1999)

3.5.2 Relación de *X. fastidiosa* con bacterias endófitas

La investigación de Araújo et al. (2002); identificó las comunidades de bacterias endófitas en la superficie de ramas de cítricos desinfectadas mediante siembra y desnaturalización por electroforesis. Los aislamientos dominantes fueron caracterizados por secuencia de ácidos grasos como *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp., *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans* y *Xanthomonas campestris*.

3. 6 Distribución de *X. fastidiosa*

Xylella fastidiosa está presente en algunas zonas de Norte América, en toda América Central, en el noroeste de Sur América (Purcell, 2005) y en áreas de los trópicos y subtrópicos (Purcell, 1997; citados por Almeida y Purcell, 2003b).

La distribución dada para *X. fastidiosa*, como patógeno de la vid, melocotón y cítricos en América es el siguiente: México y Estados Unidos (Alabama, Arizona, California, Florida, Georgia, Louisiana, Mississippi, Missouri, Montana, Carolina del Norte, Carolina del Sur y Texas). En el árbol de roble fue encontrado en Kentucky y hasta el norte en New York y el oeste de Virginia. En América Central está reportado afectando café en Costa Rica. En Sur América, la enfermedad de los cítricos ha sido reportada en Argentina (Blansky et al., 1991) y Brasil (Sao Paulo, Minas Gerais y Río de Janeiro, rápidamente diseminada desde su primer reporte en 1987) (Jiménez, 1987 citado por CABI/EPPO, 2005). La enfermedad en la vid ha sido reportada en Venezuela (Hernández y Ochoa, 1997) (Jiménez, 1987 citado por CABI/EPPO, 2005).

3.7 Mecanismo de transmisión de *X. fastidiosa* por los insectos vectores

Las características de trasmisión de *X. fastidiosa* conducen a la hipótesis de que la bacteria es transmitida desde el intestino anterior, es de origen ectodérmico y se pierde en cada muda de los insectos infectados (Purcell y Finlay, 1979; Purcell y Hopkins, 1996). Almeida y Purcell (2003a), no encontraron evidencia de un período de latencia, lo que también podría sugerir la hipótesis de que *X. fastidiosa* no tiene que circular dentro del insecto. Ellos encontraron que *Homalodisca coagulata* transmite la bacteria a las plantas de uva de una forma semipersistente y

que las ninfas pierden su infectividad cuando mudan. En general, las ninfas y los adultos recién emergidos transmiten más eficientemente la bacteria que otros adultos viejos o adultos de edad desconocida. El hallazgo que los vectores no transmiten después de la muda pero se reanuda después de la alimentación sobre una planta infectada, evidencia que la bacteria es transmitida desde una superficie externa del intestino anterior del vector (Almeida y Purcell, 2003a).

Existen varios factores relacionados con la eficiencia en la transmisión. Krugner et al. (2000) (citado por Pedreira, 2003), compararon la eficiencia entre las dos tribus de la familia Cicadellidae, los insectos pertenecientes a la tribu Cicadellini (*Dilobopterus costalimai* y *Bucephalogonia xanthopis*) son más eficientes que los de la tribu Proconinii (*Acrogonia* sp. y *Oncometopia faciales*). De igual manera Purcell (1994) (citado por Pedreira, 2003) reporta que la frecuencia con que los insectos visitan las plantas y el tiempo de alimentación son factores que están directamente relacionados con la eficiencia. Un último factor a considerar en la eficiencia de transmisión es la afinidad del insecto con la planta hospedera. Purcell (1979) (citado por Pedreira, 2003), observó que insectos de *Graphocephala atropunctata* tienen preferencia por las plantas perennes y arbóreas, por lo que ellos transmiten de forma más eficiente la bacteria a plantas como la vid que a sus hospederos herbáceos como la alfalfa.

El mecanismo de inoculación de la bacteria dentro de la planta es aún desconocido; sin embargo, existen algunas hipótesis. Una posible explicación, sería dada por la tensión negativa del xilema la cual sería capaz de translocar las células bacterianas presentes en el canal alimenticio del insecto en dirección a la planta (Purcell, 1989; citado por Pedreira, 2003). Una segunda hipótesis está relacionada con lo que ocurre cuando el insecto se alimenta, previo a la succión éstos promueven un decrecimiento en la presión de su aparato bucal para poder ingerir la

savia, a fin de superar la presión negativa del xilema. La válvula pre-cibarial se abre antes de que empiece la succión, lo que provoca un retorno del líquido presente en el aparato bucal del insecto a la planta. Una última hipótesis es determinada por la calidad nutricional del hospedero, ya que ellos succionan varias veces una pequeña cantidad de savia para evaluarla a través de unos sensores gustativos. En caso de que esta savia no induzca fagoestimulación, ésta vuelve a ser regurgitada a la planta, junto con ello irían las células bacterianas (Purcell, 1989; Lopes, 1996; citados por Pedreira, 2003).

3.8 Mecanismo de acción de la bacteria

Xylella fastidiosa es definida como una bacteria endófito que vive exclusivamente en las células del xilema (Purcell y Hopkins, 1996). Cuando la bacteria es depositada dentro de los vasos del xilema, ésta se multiplica y llena los espacios con microcolonias y polisacáridos extracelulares (Purcell et al., 1999; da Silva et al., 2001). Los vasos del xilema pueden llegar a ocluirse por una colonización densa de agregados bacterianos, tilosas y gomas formadas en la planta (Newman et al., 2004). Cuando los vasos del xilema se encuentran completamente invadidos estos se rompen a través de su pared celular y la bacteria se propaga a los vasos adyacentes; de esta manera se coloniza todo el xilema de la planta. La obstrucción física de los vasos del xilema causa estrés hídrico en la planta, resultando en la presencia de síntomas de quemazón que son típicos de *X. fastidiosa*. Se ha estimado que el tiempo que tarda la bacteria en colonizar, obstruir los vasos del xilema y desarrollar síntomas puede variar de cinco meses o más (Varela et al., 2001).

Los insectos con partes bucales perforadoras-chupadoras que se alimentan de la savia del xilema transmiten la bacteria desde plantas enfermas a plantas sanas. La bacteria bloquea el sistema de conducción de agua y reduce su flujo (Purcell, 2005). En la mayoría de las plantas, la bacteria tiende a acumularse en sitios específicos de la planta; en otras, se multiplica y dispersa sistémicamente a través de toda la planta. La forma en que la bacteria se dispersa varía con el tipo de hospedero y está relacionado con el tipo de síntoma expresado dependiendo de la cantidad y la extensión de la colonización (Purcell y Hopkins, 1996). La reducción en la eficiencia de transmisión podría resultar de una competencia por nicho entre *X. fastidiosa* y otros microorganismos anexos al sitio donde el insecto se alimentó (Almeida y Purcell, 2003b).

3. 9 Características de los insectos vectores

Todos los insectos que se alimentan del tejido vascular poseen un clipeo inflado que rodea una musculatura firme conectada al bombeo del diafragma, el cual permite a estos insectos alimentarse del xilema con una alta tensión negativa. Las especies varían grandemente en tamaño desde grandes (>20 mm) a pequeños (3.4 – 4.5 mm). Novota y Wilson, 1997; (citados por Redak et al., 2004) proveen evidencia que los insectos que se alimentan del xilema son más grandes que aquellos que se alimentan del floema. Esto se debe al costo metabólico de la extracción del fluido del xilema el cual decrece inversamente con el tamaño del cuerpo.

De acuerdo con Purcell y Hopkins (1996), las características documentadas de los insectos vectores de *X. fastidiosa* son:

- a) Se alimentan principalmente de la savia del xilema (Frazier; 1965, (En: Purcell y Hopkins, 1996))

- b) Pueden variar grandemente en su competencia o su eficiencia de transmisión (Severin, 1949; Turner y Pollard, 1959; Purcell, 1990. En: Purcell y Hopkins, 1996).
- c) Tienen un corto período de latencia (Purcell y Finlay, 1979).
- d) Retienen el potencial para transmitir en forma semipersistente (Purcell y Finlay, 1979) por largos periodos siguientes a la adquisición por alimentación (Severin, 1949; Purcell y Finlay, 1979, citados por Purcell y Hopkins, 1996).
- e) Adquieren e inoculan la bacteria con la misma eficiencia para la adquisición o inoculación en el periodo de acceso (Purcell y Finlay, 1979).

3.10 Rango de vectores

Todos los insectos que se alimentan del fluido del xilema pertenecen al orden Hemiptera (Hill y Purcell, 1997; Almeida y Purcell, 2003a, 2003b; Redak et al., 2004). Virtualmente todos los insectos chupadores que se alimentan principalmente de la savia del xilema son vectores potenciales de bacterias patógenas de los tejidos vasculares tales como *X. fastidiosa* y *P. syzygii* (Purcell y Hopkins, 1996). Esta última es el agente causal de la enfermedad conocida como Sumatra de los clavos (Riberts et al., 1990; Lomer et al., 1992). Redak et al. (2004) reportan en el suborden Auchenorrhyncha a la subfamilia Cicadellinae (saltahojas, familia: Cicadellidae), como aquella que incluye los más importantes vectores conocidos de *X. fastidiosa*; así mismo han sido reportados transmitiendo la bacteria insectos conocidos como salivitas o froghoppers (familia: Cercopidae) (Almeida y Purcell, 2003a, 2003b). Las cicadas (familia Cicadidae) también se alimentan del xilema pero no hay reportes publicados de estos como vectores de la bacteria (Purcell, 2005).

En total 39 especies y 19 géneros de cicadélidos han mostrado ser vectores de *X. fastidiosa* (Young, 1968a; Young, 1977b citados por Redak et al., 2004). En general, la mayor parte del conocimiento acerca de los vectores y sus habilidades de transmisión proviene de estudios hechos en experimentos controlados. Algunas de las especies descritas como vectores de *X. fastidiosa* se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Especies de insectos vectores reportados para la bacteria *Xylella fastidiosa*.

| Especies Vectores | Referencia |
|--|---|
| Cicadellidae, Tribu Cicadellini | |
| <i>Amphigonalia severino</i> De Long | Severin, 1949 ² |
| <i>Bucephalogonia xanthophis</i> (Berg) | Krugner, 2000 ² |
| <i>Dilobopterus costalimai</i> Young | Severin, 1949 ² ; Young, 1977 ² ; Purcell, 1980 ² ; Krugner, 2000 ² |
| <i>Draeculacephala minerva</i> Ball | Severin, 1949 ² ; Purcell, 1980 ² ; Hill y Purcell, 1995 ¹ |
| <i>Graphocephala atropunctata</i> (Signoret) | Severin, 1949 ² ; Purcell, 1980 ² ; Hill y Purcell, 1995 ¹ , Krugner, 2000 ² ; Yamamoto et al., 2002 ² ; Purcell y Finlay, 1979, citados por Almeida y Purcell, 2003b ¹) |
| <i>Graphocephala versuata</i> (Say) | Turner y Pollard, 1959 ² |
| <i>Helochara delta</i> Oman | Severin, 1949 ² |
| <i>Paragogia confusa</i> Oman | Severin, 1949 ² |
| <i>Plesiomata cormiculata</i> Young | Krugner, 2000 ² |
| <i>Xyphon fulgida</i> Nottingham | Severin, 1949 ² |

Tabla 1. (Cont...) Especies de insectos vectores reportados para la bacteria *Xylella fastidiosa*.

| Cicadellidae, Tribu: Procociini | |
|--|---|
| <i>Hortensia similis</i> (Walker) | Purcell, 2005 ¹ ; Brodbeck y Andersen, 2006 ¹ ; |
| <i>Caribovia coffeacola</i> (Dozier) | Brodbeck et al., 2006 ¹ . |
| <i>Acrogonia citrina</i> Marucci & Cavichioli | Brodbeck y Andersen, 2006 ¹ |
| <i>Acrogonia virescens</i> (Metcalf) | Krugner, 2000 ² |
| <i>Cuerna coastalis</i> (F.) | Yamamoto et al., 2002 ² |
| <i>Firscanus friscanus</i> (Ball) | Turner y Pollard, 1959 ² |
| <i>Homalodisca coagulata</i> (Say) | Severin, 1949 ² Blua et al., 2001 ¹ ; Almeida y Purcell, 2003 ¹ ; Almeida y Purcell, 2003a ¹ , 2003b ¹ ; |
| <i>Homalodisca ignorata</i> Melichar | Blug y Morgan, 2002 ¹ , Mizell et al., 2003 ¹) |
| <i>Homalodisca insolita</i> (Walker) | Yamamoto et al., 2002 ² Turner y Pollard, 1959 ² ; Mizell et al., 2003 ¹ |
| <i>Homalodisca lacerta</i> (Fowler) | Blua et al., 2001 ¹ Krugner, 2000 ² |
| <i>Oncometopia faciales</i> (Signoret) | Turner y Pollard, 1959 ² |
| <i>Oncometopia nigricans</i> (Walker) | |
| Cercopidae | |
| <i>Leocomiapsis scaramuzzai</i> Metcalf y Bruner | Brodbeck y Andersen, 2006 ¹ Severin, 1950 ² |
| <i>Aphrophora angulata</i> Ball | Severin, 1950 ² |
| <i>Aphrophora permutata</i> Uhler | Severin, 1950 ² |
| <i>Clastopera brunea</i> Ball | Purcell, 1980 ² |
| <i>Philaenus leucophthalmus</i> (L.) | Purcell, 1980 ² |

¹ Citados por autor.² Citados por Redak et al., 2004.

3.11 Características de dos especies vectores reportadas para Puerto Rico

3. 11.1 *Hortensia similis* Walker

3. 11. 1. 1 Características morfológicas

Los individuos pertenecientes a esta especie poseen un tamaño de 6-7mm, son conocidos como saltahojas de las gramíneas (Medina et al., 2003). Generalmente poseen un color verduzco, vertex amarillo con unas manchas cortas algo radiadas desde el ocelo, un triángulo negro que se encuentra en el borde cerca del ápice, la cabeza es de color negro con unas franjas blancas y amarillas por encima. El pronoto ampliamente amarillo en la parte anterior, escutelo de color amarillo. Las alas posteriores con venas amarillas (Caldwell y Martorell, 1952).

3. 11. 1 .2 Distribución

Esta especie es muy abundante en áreas de baja humedad pero puede ser encontrado desde altitudes sobre el nivel del mar, generalmente se encuentra en prados altos o sobre vegetación de bajo crecimiento (Caldwell y Martorell, 1952). Se encuentra ampliamente distribuida en el nuevo mundo: en la Florida y México en Norte América, Cuba, Jamaica, Trinidad, Puerto Rico, República Dominicana en el Caribe; Venezuela y Brasil en Sur América (Ramos, 1957).

3. 11. 1. 3 Plantas hospederas reportadas

Este insecto ha sido reportado en algunos cultivos, entre ellos: gandul, *Cajanus cajan* (L), calabaza, *Cucurbita mostacha* L, habichuela, *Phaseolus vulgaris* L, maíz, *Zea mays*, zanahoria, *Daucus carota* L, algodón, *Gossypium barbadense* L, arroz, *Oryza sativa* L, y algunas malezas

tales como flor de agua, *Eichhornia crassipens* (Mart) Solms y el malojillo, *Panicum muticum* Forks, L. (Martorell, 1976).

3. 11. 2 *Leocomiapsis scaramuzzai* Metcalf & Bruner.

3. 11. 2. 1 Características morfológicas

Fue descrita originalmente en Cuba, las especies de este género pueden ser fácilmente distinguidas de todo los cercópidos encontrados en Puerto Rico por su gran tamaño, su cuerpo de forma alargada y hundida. Su cabeza es más angosta que el pronoto, bastante aplastada con ocelo cerrado en el borde posterior. La parte dorsal fuertemente arqueada. Color generalmente es café rojizo con una cubierta densa y corta de color amarillento pubescente, alas hialinas con venación de color café oscuro; su tamaño oscila entre 5.50 mm (macho) y 6.30 mm (hembra) (Ramos, 1957).

3. 11. 2. 2 Plantas hospederas reportadas

Ésta especie ha sido reportada en dos especies de la familia Moraceae, *Ficus citrifolia* Mill y *Ficus stahlii* Warb (Martorell, 1976).

3. 12 Rango de hospederos

El rango de plantas hospederas de *X. fastidiosa*, es amplio, ya que coloniza miembros de por lo menos 28 a 30 familias de plantas (Hill y Purcell, 1995b; Mizell et al., 2003).

El principal hospedero es la vid (*Vitis vinifera* L.). *X. fastidiosa* causa enfermedades reconocidas tales como: clorosis variegada de los cítricos, afecta mayormente las naranjas

(*Citrus sinensis* L (Osbeck)) principalmente sobre cultivares de Hamlin, Natal y Valencia. (CABI/EPPO, 2005); la quemazón de la hoja en almendra (*Prunus dulces* (Mill.)), café (*Coffea arabica* L.), olmo (*Ulmus minor* Mill), roble (*Quercus* spp. L.), alelí (*Neerium oleander* L.) (Blua et al., 2001), sicómoro (*Platanus occidentales* L.) (Mizell et al., 2003; Purcell, 2005), melocotón (*Prunus persica* (L.)) y enanismo de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Raju et al., 1983; Hopkins y Adlerz, 1988, citados por CABI/EPPO, 2005 y Purcell, 2005)

Además, se han reportado como hospederos de *Xylella* un gran número de plantas de poca importancia económica y poco reconocidas, entre las que se incluyen: laurel de la bahía de California (*Umbrellularia californica* Pursch), zarzamora de California (*Rubus ursinus* Cham. & Schlecht.), zarzamora del Himalaya (*Rubus discolor* Weihe & Nees.), escoba francesa (*Cytisus monspessulanus* L.), cepillo de coyote (*Baccharis pilularis* DC.), café baya (*Rhamnus californica* Eschscholtz), sauco de baya (*Sambucus canadenses* L.), arce de hoja grande (*Acer macrophyllum* P.), artemisa (*Artemisia vulgaris* L.), ortiga (*Urtica dioica* L.), roble de la costa (*Quercus agrifolia* Née.), roble del valle (*Quercus lobata* Née.), playera (*Vinca minor* L.), roble venenoso (*Toxicodendron diversilobum* (Torr. & Gray)), rosa salvaje (*Rosa woodsii* Lindl.), sauce (*Salix lasiolepis* Benth), sauce rojo (*Salix lasiandra* (Benth.)E.Murray.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), arce (*Acer spp.* L.), morera (*Morus spp.* L.), olmo (*Ulmus spp.* L.) (NBII/ISSG, 2005).

Xylella fastidiosa puede residir en un gran número de plantas ornamentales, plantas silvestres y las malezas (e.g. hierbas salvajes, juncias, lirios, varios arbustos y árboles) (Raju et al., 1983; Hopkins y Adlerz, 1988, citados por Hill y Purcell, 1995b); donde aparentemente no se produce ningún desorden. Estas plantas son consideradas hospederos alternos o asintomáticos de

la bacteria (Purcell, 2005), entre estas se encuentran la maleza perenne hierba jhonson (*Sorghum halepense* (L.) Pers) (Mizell et al., 2003)

Muchas otras plantas herbáceas frecuentemente sirven de hospederos para los vectores saltahojas (Mizell et al., 2003). La hierba de las Bermudas (*Cynodon dactylon* (L.) Pers y la de agua (*Echinochloa crus-galli* (L.)) han sido reportadas como hospederos del vector en forma natural (Hewitt et al., 1949; Purcell y Frazier, 1985 citados por Hill y Purcell, 1997).

Las plantas con altas poblaciones bacteriales e infecciones sistémicas son más importantes para una epidemia, sólo si las altas poblaciones son conducidas por más de un vector eficiente (Hill y Purcell, 1997).

Hill y Purcell (1997) encontraron que la vid y la zarzamora Himalaya (*Rubís discolor* Weihe y Ness) toleran altas poblaciones de *X. fastidiosa* y ambas plantas también tienen altas tasas de transmisión eficiente por los vectores.

3.13 Métodos de muestreo para monitorear insectos (Hemiptera: Cicadellidae)

La técnica a emplear y superficie de muestreo debe estar acorde al tipo de insecto y objetivo a perseguir durante el monitoreo. Para el caso de los hemipteros auquenorrincos, dada su movilidad, el método de captura más utilizado es la red entomológica de arrastre, de uso frecuente en vegetación herbácea. Para los muestreos arbóreos resultan más eficientes las trampas adhesivas, si bien es muy común el uso de trampas de succión. Las trampas amarillas adhesivas son apropiadas para estimar líneas generales, el grado de asociación de los insectos con los árboles que los hospedan y en consecuencia conocer los picos de máxima población (Ruesink et al., 1990; Viagiani, 1990, citados por Coll et al., 1998a).

La utilización de trampas amarillas adhesivas ha mostrado ser eficiente en el monitoreo de *Graphocephala atropunctata* (Signoret), principal vector de *X. fastidiosa* en la vid (Purcell et al., 1997 citados por Pedreira, 2003). Roberto et al. (1997) (citado por Pedreira, 2003), encontró que las trampas amarilla adhesivas son más eficientes para monitorear cicadélidos con hábito de arboreo que la evaluación visual, la red entomológica y la succión mecánica. Purcell (1994) (citado por Coll et al., 1998a); sugiere que la red de barrido presenta una ventaja para los monitoreos dada su fácil manejo y bajo costo. Pero este método apenas permite estimar la abundancia relativa en un período de muestreo, no se puede inferir acerca del tamaño y la localización del insecto en la planta así como su actividad.

3.14 Índices de biodiversidad

La biodiversidad o diversidad biológica se define como la variabilidad de los organismos vivientes en todas las fuentes, incluyendo entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos. Así como, de los complejos ecológicos de los que forman parte, esto incluye diversidad dentro de especies, entre especies y de ecosistemas (UNEP, 1992 citado por Moreno, 2001).

La diversidad α (alfa) es la riqueza de especies dentro de una comunidad particular a la que consideramos homogénea, la diversidad β (beta) es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en un paisaje (Moreno, 2001). En este estudio se analizaron los índices de diversidad de Shanon-Wiener (H'), Equidad (J') y dominancia (D) para medir la diversidad α y el índice de similaridad Bray-Curtis para medir la diversidad β .

3.14 Métodos de aislamiento y detección de *X. fastidiosa*

3.14.1 Crecimiento en medios de cultivo

Las razas de *X. fastidiosa* son difíciles de aislar y crecer en medios de cultivo axénicos, dado que la mayoría de ellas no crecen en medios de cultivo convencionales para bacterias, por lo que para su aislamiento se requieren medios especializados, tales como: PD2 (Davis et al, 1980), PW (Davis et al, 1981), CS20 (Chang y Walker, 1980) o BCYE (Wells et al., 1981) (citados por Hopkins, 1995). Básicamente la mayoría de estos medios son suplementados con uno o más constituyentes indefinidos de los cuales los más importantes son: peptona de soya, bacto triptona, peptona, peptona tripticasa y extracto de levadura y algunas sales inorgánicas (Chang y Donalson, 2000). Sin embargo, el crecimiento de *Xylella* en estos medios es lento, lo que favorece la proliferación de bacterias de crecimiento rápido, lo cual se convierte en un serio problema en su aislamiento (Hopkins, 1995).

3.14.2 Prueba de ELISA

El kit de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), usado para detección de *X. fastidiosa* (PathoScreen-Xf, Agdia, Inc., Elkhart, IN), utiliza anticuerpos policlonales contra *Xylella* para detectar la presencia de ésta en la muestra. Los anticuerpos se unen específicamente a proteínas de la pared externa de *Xf*, así mismo otras reacciones dadas por unas enzimas causan un cambio de color en proporción a la cantidad de anticuerpos unidos a las células presentes de la bacteria en la muestra. Una coloración intensa indica la presencia de un gran número de células vivas. Para su detección se requiere poblaciones de 10^5 - 10^6 UFC/mL (Wang et al, 1999)

citados por: Mundell, 2005). Una de las ventajas del método es que puede indicar la cantidad de células viables en la muestra, es una prueba fácil de manipular con un gran número de muestras (Hernández y Ochoa, 1997). A su vez esta técnica presenta ciertas desventajas como es su baja sensibilidad, no se puede distinguir células vivas de muertas, en algunas ocasiones puede dar falsos positivos, especialmente cuando se realiza con tejidos de plantas diferentes a la vid. Por último no permite diferenciar entre patotipos de la bacteria. Por lo que el aislamiento es definitivo para la confirmación de la presencia de la bacteria, dado la naturaleza de este tipo de patógenos tipo fastidioso, hace casi imposible cultivarlos usando técnicas y medios corrientes. Para superar estos problemas y tener resultados confiables es necesario usar métodos moleculares para su detección (Mundell, 2005).

3. 14.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), amplifica millones de veces segmentos específicos de *Xylella* en el DNA. La amplificación del DNA se hace visible como bandas sobre un gel, posterior a la separación en un campo eléctrico. Ha empezado a utilizarse frecuentemente para detectar la presencia de *X. fastidiosa* dado que es bastante sensitivo, permite una confirmación rápida y a su vez puede diferenciar entre razas de la bacteria. Pooler y Hartung, (1995), lograron desarrollar unos primers para la detección de la bacteria, ellos usaron análisis RADP. Schaad et al. (2002) publicaron un protocolo usando primers para amplificar la región 16S rDNA y la 16S-23S del espacio intergénico. La región 16S rRNA es una región altamente conservada y es moderadamente variable para la detección de relaciones evolutivas. Esta es utilizada como estandar para establecer relaciones filogenéticas que permiten la identificación de

familia, género y especies del Dominio Bacteria (Lane et al., 1985; Ward, 2002 citados por Rivera, 2006).

3. 15 Identificación de desconocidos bacterianos mediante análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en los organismos vivos son de tipo carboxílico, en las bacterias éstos son los principales compuestos orgánicos estructurales presentes en la pared celular. La química que ellos presentan puede ser variable, incluyendo diferencias en la longitud de la cadena, la presencia o ausencia de grupos insaturados y cadenas ramificadas, así como grupos hidróxilo (Urbina, 2001). Las bacterias Gram positivas generalmente poseen ácidos grasos con cadena ramificada, mientras que en las Gram negativas predominan los ácidos grasos de cadena lineal. Así mismo, la presencia de lipopolisacáridos en los organismos Gram negativos da lugar a la presencia de grupos hidróxilo en sus ácidos grasos (Sasser, 1990; Kunitsky, 2006).

El perfil de los ácidos grasos es una herramienta importante para la identificación bacteriana, dado que es una técnica rápida y con resultados confiables. Uno de los procedimientos usado para el análisis de ácidos grasos de muestras bacterianas, es la Pyrolysis-cromatografía de gas con espectrometría de masa (Py-GC/MS). El resultado del análisis es un cromatograma que muestra la cantidad de los componentes básicos de la muestra, junto con el espectro de masa de cada componente. El espectro de masa es usado para la identificación de cada componente y el cromatograma trabaja el perfil de la muestra (Urbina, 2001). Este método ha sido llamado FAME, dado que los ácidos grasos se modifican a la forma de su metil-ester correspondiente. Debido a que éstos últimos son más volátiles y más fáciles de medir por el cromatógrafo que los ácidos grasos originales (Urbina, 2001).

El método consta básicamente de cultivar el organismo en un medio que no contenga ácidos grasos, saponificación y metilación, extracción, análisis de cromatografía de gases con espectro de masas. Luego de la cromatografía se obtienen unos picos máximos con lo que se realiza un perfil de comparación con una base de datos, para finalmente identificar el desconocido bacteriano mediante unos modelos de reconocimiento en un programa computarizado específico. El resultado de dicho reconocimiento es presentado como un porcentaje de “probabilidad”, el sistema puede reportar hasta un 98% de probabilidad para la identificación de un aislamiento (Sasser, 1990; Urbina, 2001; Kunitsky, 2006).

Más de 300 ácidos grasos y compuestos relacionados se pueden encontrar en una bacteria. La abundancia de información contenida en estos da información cualitativa y cuantitativa. Las diferencias cualitativas usualmente dan información a nivel de género, mientras que las cuantitativas permiten diferenciar entre especies. Se deben usar células bacterianas en estado de crecimiento activo para minimizar diferencias entre cultivos, un tiempo de desarrollo no mayor de $24 \pm$ horas. Adicionalmente, el programa de software utiliza una matriz de covarianza para minimizar el impacto de estos cambios en la identificación (Sasser, 1990; Kunitsky, 2006).

3. 16 Identificación de desconocidos bacterianos mediante sistema BIOLOG®

BIOLOG® es un sistema computarizado para la identificación rápida de bacterias y levaduras, que posee una base de datos de alrededor de 1400 especies de bacterias aerobias, anaerobias y levaduras. Básicamente consiste en la utilización y oxidación de algunas fuentes de carbono que resulta en la producción de un perfil metabólico. Consiste en el uso de microplacas

que contienen 95 fuentes de carbono diferentes, el procedimiento es sencillo, se sirve una suspensión del desconocido y se incuba por 24 horas, para posteriormente leer los cambios en color de las fosas utilizadas y compararlos con la base de datos. El resultado de dicha lectura es una probabilidad e índice de similitud de dicho perfil metabólico (fuentes de carbono utilizadas) por el desconocido y las especies con iguales características presentes en la base de datos (Garland, 1999).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se dividió en las siguientes partes: se realizó un catastro de los insectos vectores y/o vectores potenciales de la bacteria *Xylella fastidiosa* en cuatro fincas de café localizadas en el área sur y centro de Puerto Rico. Así mismo, se aislaron, caracterizaron e identificaron bacterias morfológicamente diferentes que estuvieron presentes en tres especies de insectos vectores potenciales de la bacteria, a nivel de cabeza y cuerpo; desinfestado y sin desinfestar. Finalmente, se aislaron y caracterizaron bacterias presentes en el tejido vascular de plantas de café.

4.1 Catastro de insectos vectores y/o vectores potenciales de *X. fastidiosa* en cuatro fincas de café tres en localidades de Puerto Rico.

4.1.1. Localización y caracterización del área de estudio

Los catastros de insectos fueron conducidos en el período comprendido entre los meses de junio a noviembre de 2006. En dos municipios del área sur de Puerto Rico (Yauco y Juana Díaz) y uno central (Adjuntas). Se ubicaron cuatro fincas de café *Coffea arabica* L. bajo diferentes condiciones de manejo de cultivo.

En Adjuntas, el experimento fue instalado en la finca localizada en la Carretera 526, Km 6.6 del Barrio Tanamá (latitud 18°13'12.1"N y longitud 66° 45' 55.6"W, Altitud: 637 m.s.n.m) los datos de geoposición fueron tomados con el GPS map 176 marca GARMIN. Con precipitación media anual de 2,120.1 mm y temperatura anual fluctúa (15.1 – 26.2 °C) (Historical

Climate Summaries, 2005). La variedad de café muestreada fue Limaní, edad 12 - 15 años, bajo manejo químico moderado, las plantas reciben abono 12-5-15+3 (P-K-N y 3% Mg) anual y aldicarb para el control de insectos. En la finca se observó poca vegetación rastrera asociada. Se identificaron dos gramíneas *Eleusine indicada* (L) Gaertn y *Digitaria sanguinalis* (L) Scop y una herbácea de la familia Commelinaceae (*Commelina nudiflora* L.).

En Juana Díaz, el experimento fue instalado en la Finca ubicada en la carretera 517 km 4.4 del Barrio Coyores (latitud 18°8'37.4"N y longitud 66°51'19.4"W, Altitud 495 m.s.n.m.), precipitación media anual 1,049.8 mm y la temperatura anual fluctúa (20.5 – 31.8 °C) (Historical Climate Summaries, 2005). La variedad de café allí plantada era Borbón, edad aproximada de 15 años, sin ningún tipo de manejo. La vegetación rastrera presente en su gran mayoría estaba compuesta por herbáceas de la familia Commelinaceae (*Commelina difusa* Burm, f.), Asclepiadiaceae (*Asclepias curassavica* L.), cucurbitaceae (*Momordica charantia* L.).

En Yauco, se situaron dos Fincas; la primera localizada en la carretera 372, llamada Villa Cecilia (latitud 18°08'1.2"N y longitud 66°50'2.7"W, Altitud 795 m.s.n.m); la otra situada en el sector Sierra Alta carretera 375 (latitud 18°06'13.4"N y longitud 66°49'42.7"W, Altitud 412 m.s.n.m). El municipio de Yauco presenta una precipitación media anual de 1,908.6 mm, la temperatura anual fluctúa (15.0 – 27.9 °C) (Historical Climate Summaries, 2005). En la finca de Villa Cecilia la variedad de café plantada era Caturra, con un desarrollo de 10 a 12 años, catalogada como de alto control químico, las plantas reciben abono 12-5-15+3 (P-K-N y 3% Mg) anual, con la misma frecuencia se aplica aldicarb para control de insectos, así mismo el predio es asperjado con glifosato dos veces al año para eliminar malezas. En la vegetación rastrera asociada predominaron las gramíneas *Paspalum virgatum* L, *Eleusine indica* (L.) Gaertn., y una

herbácea de la familia Commelinaceae (*Commelina difusa* Burm,f.). En tanto que para Sierra Alta la variedad de café muestreada fue Borbón, con un tiempo de desarrollo de 15 años, esta finca no recibe ningún tipo de tratamiento químico para insectos y malezas, la vegetación rastrera estuvo compuesta en su mayoría de herbáceas de la familia Cucurbitaceae (*Momordica charantia* L.) y Commelinaceae (*Commelina difusa* Burm, F).

4.1.2 Métodos de colección

La colección de los insectos se realizó usando trampas amarillas con pegante (Insect trap coating, compañía Tangle Foot) y de dimensiones 8.5 X 11.5 cm (Figura 1A), siguiendo la metodología empleada por Pooler et al., 1997 y Pedreida, 2003. Así mismo se realizaron barridos con red entomológica de 33 cm de diámetro (Pedreida, 2003). La frecuencia y número de colectas variaron de acuerdo al método de muestreo (Tabla 2).

A. Muestreo con trampas amarillas: Para el muestreo usando las trampas de pegante se marcó una parcela de 40x40m, en ésta se instalaron al azar y en forma de zig-zag dentro de la parcela 15 trampas, las cuales fueron amarradas a una altura de 1.5 m en las ramas de la periferia de los árboles, siguiendo la metodología utilizada por Pedreida, 2003 (Figura 1A).

B. Red entomológica: Se muestreó mensualmente la vegetación rastrera presente dentro de la parcela, para ello se escogieron cinco puntos al azar y se realizaron 30 barridas por punto (Figura 1B).

Tabla 2. Frecuencia y número total de colectas realizado sobre plantas de café, *Coffea arabica* en cuatro fincas, durante junio a noviembre de 2006.

| Localidad | Finca | Frecuencia de Colecta | | Total de colectas | |
|------------|---------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----|
| | | Trampas amarillas | Red entomológica | Trampa | Red |
| Juana Díaz | Carretera 517 | Quincenal | Mensual | 12 | 6 |
| Adjuntas | Carretera 526 | Quincenal | Mensual | 12 | 6 |
| Yauco | Villa Cecilia | Quincenal | Mensual | 12 | 6 |
| Yauco | Sierra Alta | Quincenal | Mensual | 12 | 6 |



Figura 1. Métodos utilizados para la captura de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) (A) Trampas Amarillas con pega, (B) Red entomológica.

4.1.3 Identificación de los insectos

Las muestras de insectos colectados por los dos métodos de captura se transportaron al laboratorio de Bacteriología del Departamento de Protección de Cultivos localizado en la finca Alzamora. Estas facilidades se encuentran ubicadas en el Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico.

Aquellos colectados con la red entomológica pasaron por un proceso de selección, donde se separaron de restos vegetales y otros insectos. Los capturados con las trampas amarillas con

pega fueron retirados de éstas con ayuda de una aguja de disección y etanol al 95%. Solo se tuvieron en cuenta aquellos insectos que se alimentan del fluido del xilema, según la literatura estos pertenecen al orden Hemiptera, sub-orden Auchenorrhyncha (Hill y Purcell, 1997; Almeida y Purcell, 2003a, 2003b; Redak et al. 2004). Posterior a este proceso de selección preliminar, fueron nuevamente separados basándose en diferencias morfológicas, seguido se etiquetaron (especie o morfoespecie, fecha de colección y método de colección), contados y colocados en viales con etanol al 70%.

Previo a su identificación los insectos se montaron en agujas entomológicas, con ayuda del esteroscopio y la clave dicotómica de Borror (Triplehorn y Johnson, 2005), se identificaron hasta familia. Posteriormente se logró llevar hasta género, a algunos de éstos, mediante comparación con ejemplares de la colección de referencia del Departamento de Biología del RUM-UPRM. La identificación a nivel de especie para aquellos considerados vectores potenciales fue realizada por los doctores Brent Brodbeck de la Universidad de Florida y Stuart McKamey del Instituto Smithsonian en Estados Unidos.

4.1.4 Análisis de datos

4.1.4.1 Análisis faunístico

Los datos de las colecciones fueron tabulados y sometidos a un análisis faunístico, donde se les determinó los índices de constancia, frecuencia, abundancia y dominancia. Aquellas especies que presentaron los mayores índices fueron determinadas como predominantes para cada sitio de muestreo (Silveira et al., 1995 citados por: Pedreira, 2003).

4.1.4.1.1 Constancia

Representa el porcentaje de ocurrencia de cada especie en relación al total de muestreos. Se calculó mediante la clasificación de Bödenheimer (dos Santos et al., 2004). Las especies fueron dispuestas en las siguientes clases:

- Constantes (W): Cuando el porcentaje de ocurrencia por especie es igual o superior al 50%.
- Accesorias (Y): Cuando el porcentaje de ocurrencia por especies está entre 25 y 50%.
- Accidental (Z): Cuando el porcentaje de ocurrencia es igual o inferior al 25%.

4.1.4.1.2 Frecuencia

Representa el porcentaje de individuos de cada especie en relación al total de individuos colectados (Silveira et al., 1976. citados por Pedreira, 2003). Con los resultados se estableció una frecuencia correspondiente a cada especie. A través de un intervalo de confianza (IC) a 5% de probabilidad (Fazolin, 1991 citados por Pedreira, 2003). Se establecieron las siguientes clases:

- Muy frecuentes (MF): Cuando el porcentaje de individuos colectados fue mayor que el límite superior de IC a 5% de probabilidad.
- Frecuentes (F): Cuando el porcentaje de individuos colectados se situó dentro del IC a 5% de probabilidad.
- Poco frecuentes (PF): Cuando el porcentaje de individuos colectados fue menor que el límite inferior de intervalo de confianza a 5% de probabilidad.

4.1.4.1.3 Abundancia

Se define como el número de individuos por unidad de superficie y volumen en el espacio y tiempo (Silveira et al., 1976 citados por: Pedreira, 2003). Se calculó mediante la suma total de individuos por especie, a través de IC de la media aritmética, para 5% y 1% de probabilidad. Se establecieron las siguientes clases de abundancias.

- rara (r): Número de individuos colectados fue menor que el límite inferior de IC a 1% de probabilidad.
- disperso (d): Número de individuos capturados se situó entre los límites inferiores de los IC a 5% y 1% de probabilidad.
- común (c): Número de individuos colectados se situó dentro del IC a 5% de probabilidad.
- abundante (a): Número de individuos capturados se situó entre los límites superiores de IC a 5% y 1% de probabilidad.
- muy abundante (ma): Número de individuos capturados mayor que el límite superior de IC a 1% de probabilidad.

Para el cálculo de los intervalos de confianza, los datos se transformaron a logaritmo natural usando el programa Infostat (Infostat, 2006).

4.1.4.1 .4 Dominancia

Constituye la relación ejercida por los organismos dominantes de una comunidad. Se calculó utilizando el método de Kato et al. (1952) (citados por Laroca & Mielke, 1975) de acuerdo a los siguientes límites:

$$\text{Límite superior (LS): } \frac{n_1 F_o}{n_2 + n_1 F_o}$$

Donde $n_1 = 2(k+1)$ y $n_2 = 2(N-k+1)$

$$\text{Límite inferior (LI): } 1 - \left[\frac{n_1 F_o}{n_2 + n_1 F_o} \right]$$

Donde $n_1 = 2(N-k+1)$ y $n_2 = 2(k+1)$

N = número total de individuos colectados

k = número de individuos de cada especie

F_o = valor obtenido de la tabla de distribución de F, grados de libertad de n_1 y n_2 ($p = 0.05$).

Fueron consideradas especies dominantes las que presentaron un LI mayor que el LS para $k = 0$.

4.1.4.2 Índices de biodiversidad alfa y beta

4.1.4.2.1 Índices de biodiversidad alfa

Los índices de biodiversidad alfa se les calculó con el programa computacional PAST software (Hammer, 2002).

4.1.4.2.1.1 Riqueza de especies (r)

La riqueza de especies (r) se define como el número total de especies presentes por muestreo. Esta estimación siempre es un valor no mayor de la riqueza de la comunidad.

4.1.4.2.1.2 Abundancia

La abundancia total de cada especie por sitio de muestreo y mes de muestreo se calculó como la sumatoria de todos los individuos colectados en los doce muestreos.

4.1.4.2.1.3 Índice de Shannon-Wiener (H')

Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Se basa en suponer que la heterogeneidad depende del número de especies presentes y de su abundancia relativa. PAST utiliza la siguiente función:

$$H' = -\sum \frac{n_i}{n} \ln\left(\frac{n_i}{n}\right)$$

Adquiere valores entre 0, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de r (riqueza observada en la muestra) cuando todas las especies están presentes en el mismo número de individuos (Moreno, 2001).

4.1.4.2.1.4 Equidad (J')

Mide la uniformidad con la que los individuos son divididos entre las especies presentes. Se calcula dividiendo la diversidad de Shannon entre el logaritmo natural de número de especies. PAST utiliza la siguiente función:

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

Donde: H' = diversidad de especies observadas.

H'_{max} = diversidad de especies máximas = $\ln(S)$

4.1.4.2.1.5 Dominancia (D)

Los índices de dominancia son parámetros inversos al concepto de uniformidad o equidad. Toman en cuenta la representatividad de las especies con mayor valor de importancia sin evaluar la contribución del resto de las especies (Moreno, 2001). Adquiere valores desde 0 (todas las especies están igualmente presentes) a 1 (una especie domina la comunidad completamente). PAST utiliza la siguiente ecuación:

$$D = \sum \left(\frac{n_i}{n} \right)^2$$

4.1.4.2.2 Índices de biodiversidad beta

Estos índices se estimaron con el programa *EstimateS* (Coldwell, 2005).

4.1.4.2.2.1 Coeficiente de similitud de Bray-Curtis (Sorensen clásico)

Se calcula utilizando datos cuantitativos (abundancia proporcional de cada especie) (Moreno, 2001). Utiliza la siguiente ecuación:

$$I_{scuant} = \frac{2pN}{2aN + bN}$$

Donde:

aN : Número total de individuos en el sitio A.

bN : Número total de individuos en el sitio B.

pN : Sumatoria de la abundancia más baja de cada una de las especies compartidas entre ambos sitios.

4.2 Muestreo, caracterización morfológica y bioquímica de colonias bacterianas presentes en la cabeza y cuerpo, desinfestado y sin desinfestar de tres insectos.

4.2.1 Colección de Muestras

Durante el período de abril a noviembre de 2006, se realizaron seis colecciones de tres especies de insectos vectores potenciales (*Hortensia similis*, Walker, *Caribovia coffeacola* (Dozier) y *Apogonalia* spp.). Usando la red entomológica se capturaron mensualmente 16 individuos por especie, los cuales fueron separados en grupos de cuatro y colocados en frascos estériles.

Las colecciones se realizaron en dos localidades de Puerto Rico: Yauco y Adjuntas. La especie *H. similis* fue colectada en Yauco (Finca Villa Cecilia), sobre la gramínea *Eleusine indica* (L) Gaertn y la herbácea de la familia Commelinaceae (*Commelina difusa* Burm, f.). En esta misma localidad (Sector Sierra Alta) se colectaron los individuos de la especie *Apogonalia* spp. los cuales se encontraron mayormente en una herbácea de la familia Cucurbitaceae (*Momordica charantia* L.). Los insectos de la especie *C. coffeacola* fueron colectados en el municipio de Adjuntas (Carretera 526) directamente sobre las plantas de café *C. arabica* L.

El procesamiento de los insectos, los aislamientos, la purificación y posterior caracterización morfológica y quimiotaxómica de las bacterias obtenidas, fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología Agrícola del Departamento de Protección de Cultivos del Recinto Universitario de Mayagüez, ubicado en la Finca Alzamora.

4.2.2 Aislamiento de bacterias

Se evaluaron las bacterias presentes a nivel interno y externo, para ello se tomaron cuatro frascos con cuatro insectos por especie, cada grupo constituyó un tratamiento: 1. cuerpo

completo desinfestado, 2. cuerpo completo sin desinfestar, 3. cabeza desinfestada y 4. cabeza sin desinfestar. Cada tratamiento con tres repeticiones.

Para los tratamientos de cuerpo y cabeza desinfestados, se realizaron inmersiones sucesivas de insectos completos, en etanol al 90%, hipoclorito de sodio al 2% y tres lavados con agua destilada estéril, cada una por 1 minuto (Hill y Purcell, 1995). Para el aislamiento de bacterias a partir de la cabeza se usó el estereoscopio, la cabeza se separó tratando de incluir el aparato bucal y parte del intestino anterior, sitio donde puede residir *X. fastidiosa* (Brlansky et al., 1991 citados por: Blake et al., 2004; Almeida y Purcell, 2003a).

Para el cultivo de las bacterias localizadas tanto en las cabezas como en los cuerpos de los insectos, cada uno de los tejidos se maceró y colocó por 30 minutos en viales que contenían agua destilada esterilizada y 100 µl de medio líquido “Periwinkle wilt” (PW), el cual es selectivo para detectar la presencia de bacterias de tipo fastidioso (Schaad et al., 2001). El medio PW contiene: Soytone 4.0 g/L, Tryptone 1.0 g/L, hemin cloruro 10.0 mg/L, MgSO₄.7 H₂O 0.4 g/L, K₂HPO₄ 1.2 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, (NH₄)₂ HPO₄ 0.8g/L, rojo fenol 20.0 mg/L, L-glutamina 4.0 g/L, L-Histinida HCl 1.0 g/L, suero bovino 6.0 g/L, almidón de papa soluble 2.0 g/L y ciclohexamida 25.0 mg/L. Luego se dispersaron dos gotas de 20 µl de la suspensión en medio de cultivo sólido (PW) (Almeida y Purcell, 2003; Newman et al., 2004). Las placas fueron incubadas a 27.2°C en incubadora (Precision Scientific®) por 30 días, se registraron las bacterias presentes cada 48 horas.

4.2.3 Caracterización de bacterias

Todas aquellas colonias que presentaron características morfológicas diferentes (color, tamaño, configuración, borde y elevación), fueron purificadas realizando tres transferencias consecutivas, la primera en PW y las otras dos en YDCA (Extracto de Levadura Difco 10g/L, Dextrosa Difco 10g/L, CaCO₃ 2.5 g/L y Agar Difco 20g/L). Una vez puras, se les asignó un número de registro. Posteriormente, se caracterizaron bioquímica y fisiológicamente, mediante cuatro pruebas de laboratorio. En primer lugar, se realizó la prueba de hidróxido de potasio (KOH) al 3% la cual es una prueba indirecta de la reacción Gram (Suslow et al., 1982), se reconfirmaron los datos obtenidos en la prueba de KOH mediante tinción diferencial Gram, con ésta a su vez se registró la morfología celular. La prueba de Catalasa permite diferenciar bacterias aeróbicas de anaeróbicas; la tercera, la reacción de Oxidasa diferencia las bacterias en entéricas y no entéricas. Por último, a las bacterias Gram positivas se les realizó la tinción de esporas (Schaad et al., 2001).

4.2.4 Identificación mediante el análisis de ácidos grasos (CG-FAME)

Aislamientos puros de 53 aislamientos con diferentes características morfológicas y quimiotaxónomicas, se transfirieron a viales con 2.5 mL de medio de cultivo TSA sólido (Agar con soya tríptica Difco 40 g/L; este medio contiene Triptona, Peptona, digerido pancreático de caseína 15.0 g/L, digerido de papáinico de soya 5.0 g/L, cloruro de sodio 5.0 g/L y agar 15.0 g/L). Este medio es útil para este tipo de análisis ya que no contiene fuente de ácidos grasos que el organismo pueda extraer, lo cual interfiere con el resultado (Kunitsky, 2006). Estos se

incubaron por un período de 24 horas a 27.2°C en incubadora (Precision Scientific®). Luego de este periodo fueron enviados al Laboratorio de identificación de bacterias y análisis de ácidos grasos del departamento de Patología de Plantas de la Universidad de Florida, para su identificación mediante el análisis de ácidos grasos.

4.2.4.1 Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre el número de colonias morfológicamente diferentes por especie de insecto, tejido (cabeza – cuerpo) de aislamiento y tratamiento (desinfestado – sin desinfestar), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y una prueba de medias de Tukey al 5% de significancia, usando Infostat (Infostat, 2006). De igual manera, los resultados obtenidos de la identificación de desconocidos bacterianos, mediante la secuenciación de ácidos grasos, se sometieron a un análisis de conglomerados (“cluster análisis”) usando Infostat (Infostat, 2006). Se usaron los siete diferentes algoritmos de agrupamiento disponibles en Infostat y se seleccionó el de mayor relación cofenética. La distancia seleccionada fue la Euclidea con datos estandarizados. El dendograma generado de cada algoritmo se analizó con el fin de determinar la cantidad de conglomerados, que permitieran agrupar los géneros bacterianos de acuerdo a su origen de aislamiento.

4.2.4 Detección de *X. fastidiosa* por el método ELISA-DAS en los desconocidos bacterianos Gram negativos.

Se utilizó el kit de ELISA para la detección de *X. fastidiosa* llamado PathoScreen-Xf (Agdia, Inc., Elkhart, IN) el cual es recomendado en la guía de laboratorio de Schaad et al. (2001). Para los cultivos puros se tomaron dos alicuotas de 1 µL de crecimiento bacteriano. Estos

fueron suspendidos en 600 μ L de amortiguador de extracción contenidos en viales de 1.5 mL, para asegurar la homogeneidad de la dilución cada uno de los viales fue agitado usando el vórtex por un periodo no menor de tres minutos. Se colocaron 100 μ L de suspensión de cada muestra por celda. Luego se incubó en nevera (4°C) por 24 horas. Posteriormente, la placa se lavó 10 veces con amortiguador fosfato salino diluido PBS-TP (Phosphate buffer saline + Tween 20 + Polyvinyl pyrrolidone (PVP)). Previo a los lavados se preparó la enzima conjugada diluyendo la concentrada en PBS-TP en relación 1:4. A cada una de las celdas se le añadió 100 μ L de la enzima y la microplaca fue incubada a temperatura ambiente (25°C) por dos horas. Nuevamente se realizaron 10 lavados con PBS- TP. Finalmente, se agregó 100 μ L por celda de la solución sustrato OPD (40 μ L de peróxido de hidrógeno al 30 % en 100 mL de solución) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido este tiempo se efectuó la lectura de los resultados siguiendo las instrucciones del fabricante, algunos de los observados como positivos (cambio en coloración) se reconfirmaron en un espectrofotómetro marca Advanced Instruments.

4.3 Aislamiento y purificación de bacterias de tejidos vegetales

Durante los meses de septiembre a noviembre de 2006, se realizaron tres colecciones de tejido de plantas de café *C. arabica* L. Los muestreos se realizaron en las mismas cuatro fincas ubicadas para el catastro de los insectos. Cada muestreo consistió de tres ramas de 15 plantas al azar; tratando de coleccionar muestras principalmente de aquellas que mostraran síntomas posiblemente asociados con *X. fastidiosa* (defoliación, clorosis, hojas arrugadas en los bordes).

El procesamiento de los tejidos traídos de las diferentes localidades, los aislamientos, la purificación y caracterización de las bacterias obtenidas, se realizó de igual manera en el Laboratorio de Bacteriología del RUM.

De las tres ramas colectadas se seleccionaron cinco hojas; cada una de estas fue limpiada con un cepillo y jabón para eliminar al máximo organismos presentes en las partes externas y posibles contaminantes. Se cortó un trozo de 3 cm de la parte de la vena principal y pecíolo; estos fueron desinfectados por inmersiones sucesivas de 1 minuto en etanol al 70%, luego en hipoclorito de sodio al 20% y tres lavados con agua destilada estéril.

Para el cultivo de las bacterias internas localizadas en dichos tejidos vegetales, cada uno de los trozos desinfectados fue cortado en trozos más pequeños de 1 mm aproximadamente. Estos fueron colocados en 2 ml de medio líquido PW por espacio de 30 minutos a temperatura ambiente y 24 horas en nevera (4°C). Luego se dispersó 100 µl en platos petri con medio de cultivo PW y se colocaron en incubadora (Precision Scientific®) a 27.2°C por 30 días, registrándose las bacterias presentes cada 48 horas.

Todas aquellas colonias morfológicamente diferentes se purificaron y caracterizaron siguiendo la misma metodología empleada para los aislamientos provenientes de los tejidos de los insectos. Caracterización a nivel morfológico (configuración, borde, elevación, color y tamaño) y a nivel quimiotaxónomico (Tinción Gram, oxidasa, catalasa y tinción de esporas).

4.4 Identificación mediante el sistema BIOLOG® de desconocidos bacterianos obtenidos de hojas de café.

Los 68 aislamientos provenientes de las plantas, se organizaron en 12 grupos con características morfológicas y quimiotaxónomicas comunes, tales como: color de la colonia, respuesta Gram, morfología celular, respuesta a la prueba de oxidasa y catalasa. A partir de estos se tomó una bacteria representativa de cada uno, la cual se identificó utilizando la técnica de BIOLOG®. El procedimiento se realizó en tubos de 18 mL de una solución fluida, en la cual se suspendieron las bacterias purificadas y en crecimiento activo (15 – 18 horas), éstas se prepararon a un porcentaje de transmitancia, siguiendo las instrucciones del fabricante; dicha lectura se realizó a una longitud de onda de 590 nm. Posteriormente, se dispersaron 150µl de la suspensión bacteriana en cada uno de los 96 pozos de la microplaca y se incubaron por 24 horas, transcurrido este tiempo se compararon con la base de datos computarizada de acuerdo a la probabilidad e índice de similaridad se determinó la identidad de cada aislado hasta género.

Finalmente, a todas las bacterias aisladas del tejido vascular de las plantas de café se les realizó la técnica ELISA-DAS descrita anteriormente, para la detección de *X. fastidiosa*.

5. RESULTADOS

5.1 Composición y riqueza de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa* en cuatro fincas de tres localidades de Puerto Rico.

En las cuatro fincas de café en el periodo comprendido de junio a noviembre de 2006, se colectaron 7,423 insectos que pertenecen al orden Hemiptera, suborden Auchenorrhyncha. La mayor abundancia se presentó en la finca de Adjuntas 4,931 (66.4%), seguido de Juana Díaz con 1,185 (16.0%), en tanto que para los dos sitios ubicados en Yauco se encontró una proporción similar; Sierra Alta 670 (9.03%) y Villa Cecilia 637 (8.57%) (Figura 2). La mayor riqueza de especies se observó en Juana Díaz (11), seguido de Adjuntas (10), para las dos fincas ubicadas en Yauco, Villa Cecilia y Sierra Alta la riqueza estuvo representada por nueve y ocho especies, respectivamente (Figura 2).

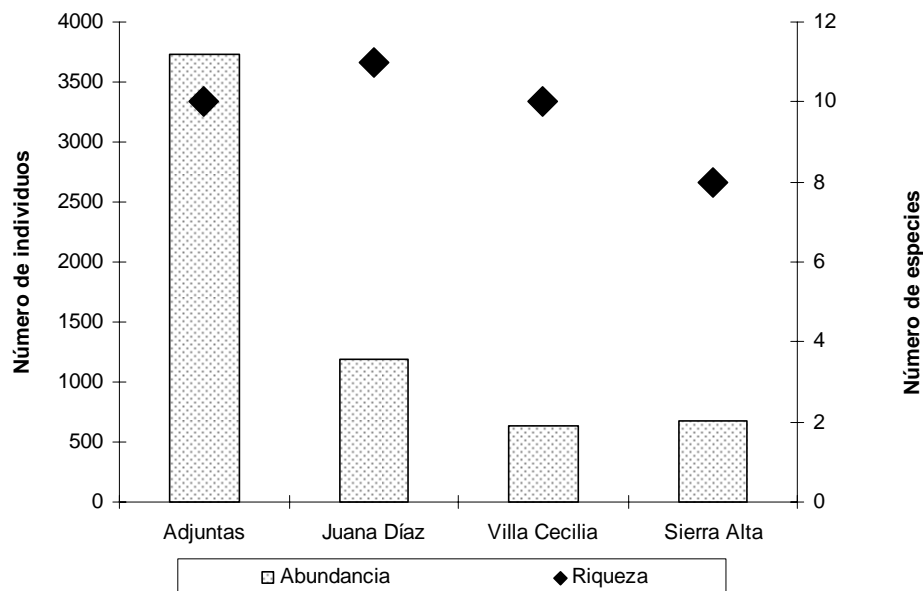


Figura 2. Riqueza y abundancia de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en las fincas de café.

El total de individuos se distribuyó en cinco familias y 12 especies (Figura 3), se identificó a las familias Cicadellidae y Cixiidae como las más representativas en cuanto al número de individuos. De igual manera, la familia Cicadellidae fue las más importante en cuanto al número de especies, ocho (66.7%) de las doce colectadas pertenecen a ésta.



Caribovia coffeacola (7-9mm)



Hortensia similis (6-7 mm)



Apogonia spp. (5-6 mm)



Agalliopsis pepino (2-3 mm)



Agallia pulchra (3-4mm)



Scaphytopius neloricatus (4-5mm)



Cicadellidae sp1. (4-5mm)



Cicadellidae sp2. (5-6mm)

*Bothriocera* spp. (6-7 mm)*Nesshorinus* spp. (6-8mm)

Achilidae sp1. (8-9 mm)



Tropiduchidae sp1. (10-12mm)

Figura 3. Especies de insectos (Hemiptera:Auchenorrhyncha) colectados en fincas de café. Cicadellidae (A-H), Cixiidae (I), Membracidae (J), Achilidae (K), Tropiduchidae (L).

Las principales especies con respecto al número de individuos colectados fueron *Caribovia coffeacola* (73.5%), *Bothriocera* spp. (8.2%), *Apogonalia* spp. (5.7%), *Agallia pulchra* (5.5%), *Agalliopsis pepino* (3.8%) y *Hortensia similis* (1.0%), las demás especies representaron 2.3% del total colectado (Figura 4).

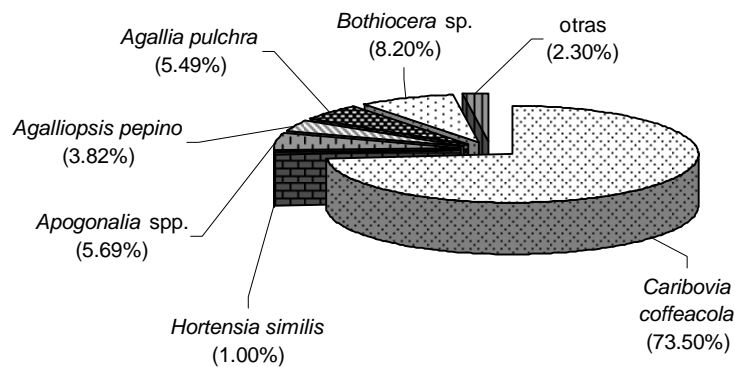


Figura 4. Frecuencia relativa de las especies (Hemiptera:Auchenorrhyncha) en las cuatro fincas de café.

Las especies comunes para las cuatro fincas de muestreo fueron: *C. coffeacola*, *H. similis*, *Agallia pulchra*, *Bothriocera sp.* y *Scaphytopius neloricatus*. *C. coffeacola* fue la más abundante en tres de las cuatro fincas (Adjuntas, Juana Díaz y Villa Cecilia). Mientras que para Sierra alta fue *Apogonalia spp.*, así mismo, esta especie sólo se colectó en ésta finca y en Juana Díaz. Las especies, *Agalliopsis pepino* y *Nesshorinus sp.* se colectaron en tres de las cuatro fincas, la primera no se encontró en Juana Díaz y la segunda no se encontró en Yauco, Sierra Alta. (Anexos 1 al 4).

5.2 Caracterización de la comunidad de Hemiptera; suborden Auchenorrhyncha

5.2.1 Finca localizada en Adjuntas, carretera 526 – Km 6.6

5.2.1.2 Riqueza y abundancia de especies

En esta finca se realizaron 12 colecciones utilizando las trampas amarillas con pega; se colectó un total de 4,931 individuos, distribuidos en cinco familias y 10 especies (Tabla 3).

En cuanto a la riqueza de especies desde el punto de vista temporal, se observó una mayor cantidad durante los dos muestreos realizados en los primeros muestreos de los meses de junio y julio (8). Así mismo, la riqueza mostró un marcado descenso para los dos muestreos del mes de septiembre y los primeros de los meses de octubre y noviembre (3) (Figura 5). En cuanto a las mayores abundancias de individuos se registró en los dos muestreos del mes de junio (563 y 622); las menores abundancias se registraron para el segundo muestreo de septiembre y el primero de octubre (Figura 5).

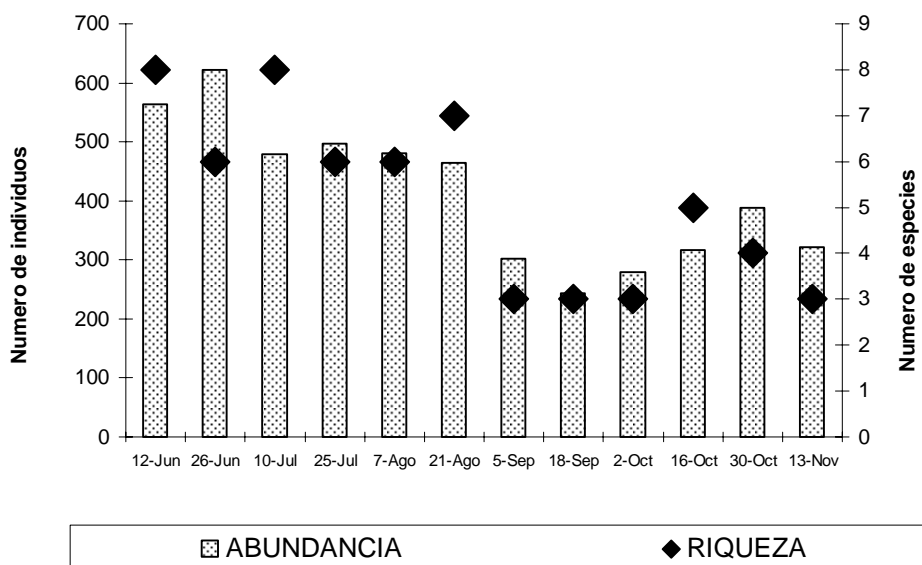


Figura 5. Variación temporal de la riqueza y abundancia de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en la finca de Adjuntas.

5.2.1.1 Análisis faunístico

Se encontró una especie superdominante, siete dominantes y dos no dominantes. Con relación a la abundancia, una fue muy abundante, una común, una dispersa y siete raras. En el análisis de la frecuencia se encontró una muy frecuente, dos frecuentes y siete poco frecuentes. Por último sólo una de estas especies fue constante, dos accesorias y siete accidentales (Tabla 3).

A través del análisis faunístico se identificó a *C. coffeacola* como predominante ya que ésta fue clasificada como superdominante (SD), muy abundante (ma), muy frecuente (MF) y constante (W). Lo que indica que estuvo presente en las plantas de café durante todo el tiempo de muestreo. Las especies *Agallia pulchra* y *Bothriocera* sp. fueron dominantes (D), frecuentes (F) y accesorias (Y); estas dos especies sólo se diferenciaron en su abundancia la primera fue clasificada como dispersa (d) y la segunda como común (c). La especie *H. similis* fue dominante (D), rara (r), poco frecuente (PF) y accidental (Z), estos datos indican que esta especie no está todo el tiempo presente en las plantas. Aunque si se observó en la maleza presente en la finca.

Tabla 3. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados Finca de Adjuntas durante junio a noviembre de 2006.

| Familia | Especies | Total ⁽¹⁾ | D ⁽²⁾ | A ⁽³⁾ | F ⁽⁴⁾ | C ⁽⁵⁾ |
|---------------|---------------------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cicadellidae | | | | | | |
| | <i>Caribovia coffeacola</i> | 4,465 | SD | ma | MF | W |
| | <i>Hortensia similis</i> | 17 | D | r | PF | Z |
| | <i>Agalliopsis pepino</i> | 55 | D | r | PF | Z |
| | <i>Agallia pulchra</i> | 162 | D | d | F | Y |
| | <i>Scaphytopius neloricatus</i> | 4 | ND | d | PF | Z |
| | Cicadellidae sp1 | 26 | D | r | PF | Z |
| Membracidae | | | | | | |
| | <i>Nesshorinus</i> spp | 26 | D | r | PF | Z |
| Achilidae | | | | | | |
| | Achilidae sp1 | 18 | D | r | PF | Z |
| Cixidae | | | | | | |
| | <i>Bothriocera</i> sp. | 155 | D | c | F | Y |
| Tropiduchidae | | | | | | |
| | Tropiduchidae sp1 | 3 | ND | r | PF | Z |

Letras en negrilla representan las especies predominantes seleccionadas a través de los índices faunísticos.

⁽¹⁾ Total de individuos: colectados en los 12 muestreos

⁽²⁾ Dominancia – SD: super dominante; D: dominante; ND: no dominante

⁽³⁾ Abundancia – r: rara; d: disperso; c: común; a: abundante; ma: muy abundante

⁽⁴⁾ Frecuencia – MF: muy frecuente; F: frecuente; PF: poco frecuente

⁽⁵⁾ Constancia – W: constante; Y: Accesorias; Z: Accidental

La familia Cicadellidae se destacó en cuanto al porcentaje de individuos colectados representó el 95.9% del total (Figura 6A). De igual manera, en cuanto a los porcentajes de individuos por especie sólo se encontró un número significativo para tres de ellas, hubo un predominio de *C. coffeacola* (90.6%); en tanto que para las otras dos especies *A. pulchra* y *Bothriocera* sp., los porcentajes fueron similares 3.3 y 3.1%, respectivamente (Figura 6B).

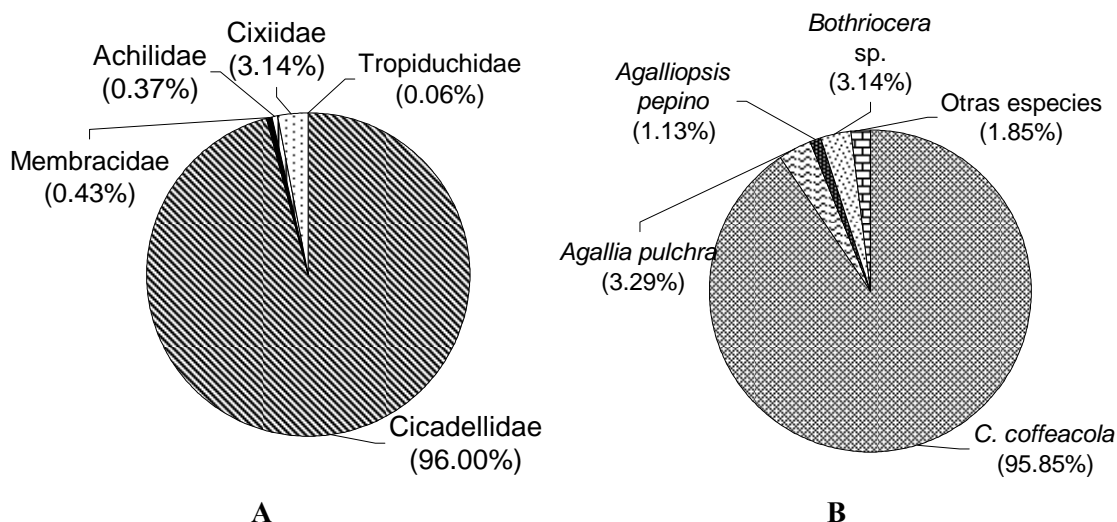


Figura 6. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha), colectados en la finca de Adjuntas durante junio a noviembre de 2006. Familias (A), Especies (B).

5.2.2 Finca localizada en Juana Díaz. Barrio Coyores. Carretera 517

5.2.2.1 Riqueza y abundancia de especies

En esta finca se realizaron 12 colecciones utilizando las trampas amarillas con pega; se colectó un total de 1,185 individuos, distribuidos en cinco familias y 11 especies (Tabla 4).

En cuanto a la riqueza de especies desde el punto de vista temporal, se observó una mayor cantidad durante los dos muestreos del mes junio (9) y el segundo de septiembre (9). Así mismo, la riqueza mostró un marcado descenso para el segundo muestreo del mes de agosto (4) y

el del mes de noviembre (4). La mayor abundancia de individuos se registró en el primer muestreo del mes de junio (138); en contraste las menores abundancias fueron para tres de los doce muestreos, el primero de septiembre (73), el último de octubre (78) y el del mes de noviembre (75) (Figura 7).

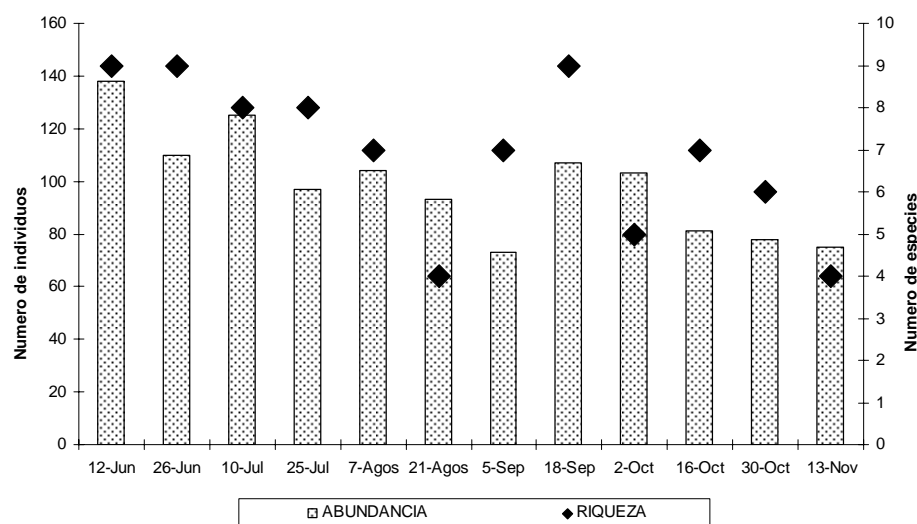


Figura 7. Variación temporal de la riqueza y abundancia de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha), en la finca de Juana Díaz.

5.2.2.2 Análisis faunístico

Se encontraron dos especies superdominantes, siete dominantes y dos no dominantes. Con respecto a la abundancia una fue muy abundante, una común y las nueve especies restantes fueron raras. Al analizar la frecuencia, una especie fue muy frecuente, una frecuente y nueve poco frecuentes. De estas una fue constante, una accesoria y nueve accidentales (Tabla 4).

A través del análisis faunístico se determinó a la especie *C. coffeacola* como predominante ya que esta fue clasificada como superdominante (SD), muy abundante (ma), muy frecuente (MF) y constante (W). Lo que indica que estuvo presente durante todos los muestreos

en las plantas de café. La especie *Bothriocera* sp. fue clasificada como superdominante (SD), común (c), frecuente (F) y accesoria (Y). Las especies *H. similis* (1.4%), *Apogonalia* spp. (2.9%), *A. pulchra* (3.3%) y *S. neloricatus* (1.5%) fueron dominantes (D), raras (r), poco frecuentes (PF) y accidentales (W). Lo que indica que no están presentes en todos los muestreos y por ende en las plantas de café.

Tabla 4. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Juana Díaz durante junio a noviembre 2006.

| Familia | Especies | Total ⁽¹⁾ | D ⁽²⁾ | A ⁽³⁾ | F ⁽⁴⁾ | C ⁽⁵⁾ |
|---------------|---------------------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cicadellidae | | | | | | |
| | <i>Caribovia coffeacola</i> | 899 | SD | ma | MF | W |
| | <i>Hortensia similis</i> | 17 | D | r | PF | Z |
| | <i>Apogonalia</i> spp. | 34 | D | r | PF | Z |
| | <i>Agallia pulchra</i> | 39 | D | r | PF | Z |
| | <i>Scaphytopius neloricatus</i> | 18 | D | r | PF | Z |
| | Cicadellidae sp1 | 3 | ND | r | PF | Z |
| | Cicadellidae sp2 | 6 | D | r | PF | Z |
| Membracidae | | | | | | |
| | <i>Neshorinus</i> spp. | 3 | ND | r | PF | Z |
| Achilidae | | | | | | |
| | Achilidae sp1 | 11 | D | r | PF | Z |
| Cixiidae | | | | | | |
| | <i>Bothriocera</i> sp. | 148 | SD | c | F | Y |
| Tropiduchidae | | | | | | |
| | Tropiduchidae sp1 | 7 | D | r | PF | Z |

Letras en negrilla representan las especies predominantes seleccionadas a través de los índices faunísticos.

⁽¹⁾ Total de individuos: colectados en los 12 muestreos

⁽²⁾ Dominancia – SD: super dominante; D: dominante; ND: no dominante

⁽³⁾ Abundancia – r: rara; d: disperso; c: común; a: abundante; ma: muy abundante

⁽⁴⁾ Frecuencia – MF: muy frecuente; F: frecuente; PF: poco frecuente

⁽⁵⁾ Constancia – W: constante; Y: Accesoria; Z: Accidental

La familia Cicadellidae fue la que más se destacó en cuanto al porcentaje de individuos colectados en las trampas amarillas, dentro de ésta se ubicaron siete de las 11 especies (85.9%) (Figura 7). En cuanto a los porcentajes de individuos por especie sólo fue significativo para dos

de ellas: *C. coffecola* (75.9%) y la *Bothriocera* sp. (12.5%). En tanto, que las especies *H. similis*, *Apogonalia* spp., *A. pulchra* y *S. neloricatus* juntas representaron sólo en 9.1% del total colectado (Figura 8B).

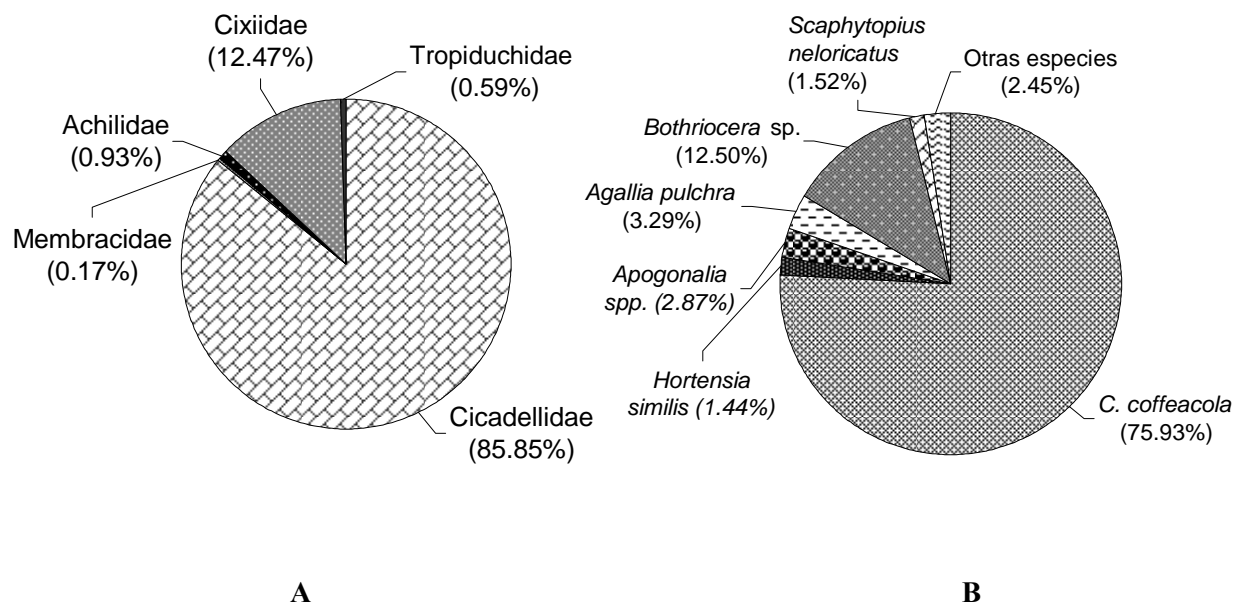


Figura 8. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Juana Díaz durante junio a noviembre de 2006. Familias (A), Especies (B).

5.2.3 Finca localizada en Yauco. Villa Cecilia, Carretera 372

5.2.3.1 Riqueza y abundancia de especies

En esta finca se realizaron 12 colecciones utilizando las trampas amarillas con pega; se colectó un total de 637 individuos, distribuidos en tres familias y nueve especies (Tabla 5).

La riqueza de especies desde el punto de vista temporal fue constante para ocho de los muestreos (4), la mayor cantidad de individuos se registró en el primer muestreo del mes de junio (8) y la menor para el primer muestreo de agosto (3). La mayor abundancia de individuos se registró en el primer muestreo del mes de junio (111); las menores abundancias fueron para

cuatro de los doce muestreos, el segundo del mes de agosto y los tres muestreos del mes de octubre, 32 individuos cada uno (Figura 9).

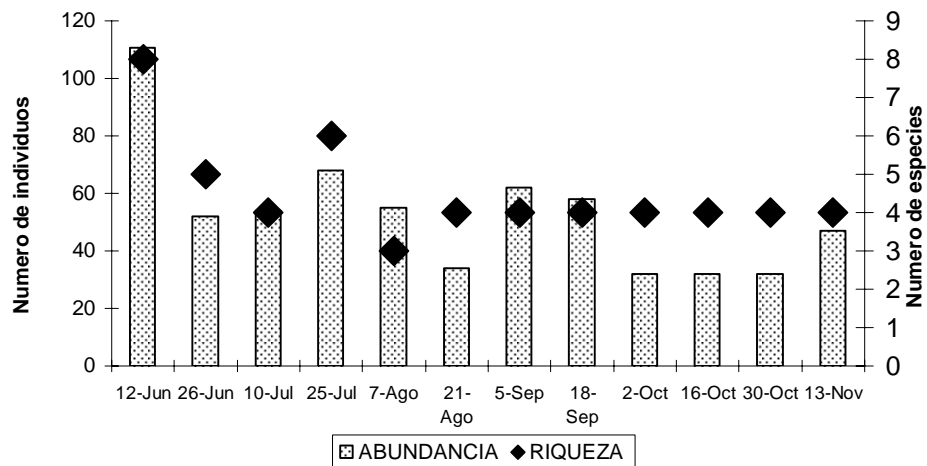


Figura 9. Variación temporal de la riqueza y abundancia de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Villa Cecilia).

5.2.3.2 Análisis faunístico

Se encontraron cuatro especies superdominantes, tres dominantes y dos no dominantes. Con relación a la abundancia, dos fueron muy abundantes, tres constantes, una dispersa y tres raras. La frecuencia mostró dos muy frecuentes, tres frecuentes y cuatro poco frecuentes. De las nueve especies, una fue constante, cuatro accesorias y cuatro accidentales (Tabla 5).

De acuerdo con al análisis faunístico se determinaron dos especies predominates las cuales fueron clasificadas como superdominantes (SD), muy abundantes (ma) y muy frecuentes (MF). Éstas fueron *C. coffeacola* (47.3%) y *A. pulchra* (23.9%), las cuales sólo se diferenciaron en la constancia; la primera fue clasificada como constante (Y) y la segunda como accesorias (W). Las especies *A. pepino* (6.7%), *Bothriocera* sp. (15.1%) y *Cicadellidae* sp1 (1.7%), fueron

comunes (c), frecuentes (f) y accesorias (Z), éstas tres se diferencian en que las dos primeras fueron superdominantes y la última dominante. En tanto que la especie *H. similis* fue clasificada como dominante, dispersa, poco frecuente y accidental (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Villa Cecilia) durante junio a noviembre 2006.

| Familia | Especies | Total ⁽¹⁾ | D ⁽²⁾ | A ⁽²⁾ | F ⁽³⁾ | C ⁽⁴⁾ |
|--------------|---------------------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cicadellidae | | | | | | |
| | <i>Caribovia coffeacola</i> | 301 | SD | ma | MF | W |
| | <i>Hortensia similis</i> | 20 | D | d | PF | Z |
| | <i>Agalliopsis pepino</i> | 43 | SD | c | F | Y |
| | <i>Agallia pulchra</i> | 152 | SD | ma | MF | W |
| | <i>Scaphytopius neloricatus</i> | 6 | D | r | PF | Z |
| | Cicadellidae sp1 | 11 | D | c | F | Y |
| | Cicadellidae sp2 | 4 | ND | r | PF | Z |
| Membracidae | | | | | | |
| | <i>Nesshorinus</i> spp. | 4 | ND | r | PF | Z |
| Cixiidae | | | | | | |
| | <i>Bothriocera</i> sp. | 96 | SD | c | F | Y |

Letras en negrilla representan las especies predominantes seleccionadas a través de los índices faunísticos.

⁽¹⁾ Total de individuos: colectados en los 12 muestreos

⁽²⁾ Dominancia – SD: super dominante; D: dominante; ND: no dominante

⁽³⁾ Abundancia – r: rara; d: disperso; c: común; a: abundante; ma: muy abundante

⁽⁴⁾ Frecuencia – MF: muy frecuente; F: frecuente; PF: poco frecuente

⁽⁵⁾ Constancia – W: constante; Y: Accesorias; Z: Accidental

La familia Cicadellidae fue la que más se destacó en cuanto al porcentaje de individuos y especies colectados, ésta representa el 84.3% del total colectado (Figura 10A). Se encontraron tres especies con una alta frecuencia relativa: *C. coffeacola* (47.2%), *A. pulchra* (23.9%) y *Bothriocera* sp. (15.1%), éstas tres especies juntas representan el 86.2% del total (Figura 10B).

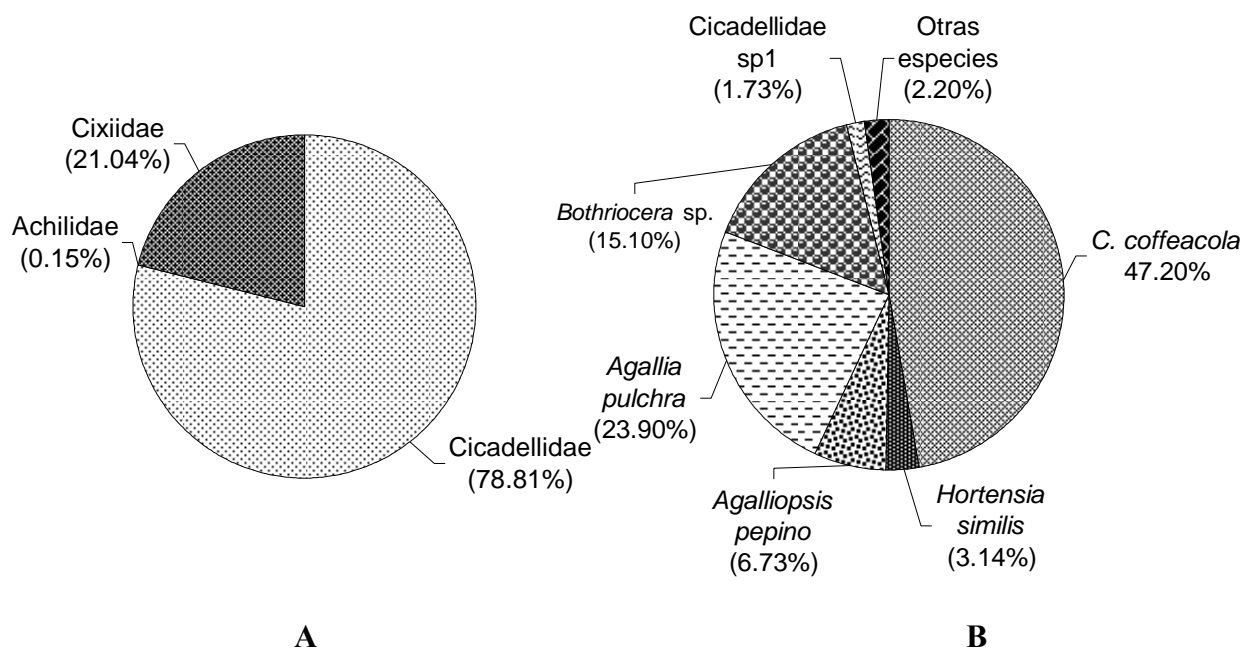


Figura 10. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Villa Cecilia) durante junio a noviembre de 2006. Familias (A), Especies (B).

5.2.3 Finca localizada en Yauco. Sierra Alta, Carretera 375

5.2.3.1 Riqueza y abundancia de especies

En esta finca se realizaron 12 colecciones utilizando las trampas amarillas con pega; se colectó un total de 670 individuos, distribuidos en tres familias y ocho especies (Tabla 6).

Desde el punto de vista temporal se observó una mayor riqueza de especies en el primer muestreo del mes de junio (6), mientras que la menor riqueza se registró en el segundo muestreo de septiembre (3). Por otra parte, la mayor abundancia se registró en el segundo muestreo del mes de julio (76) y la menor en el primer muestreo de noviembre (22) (Figura 11).

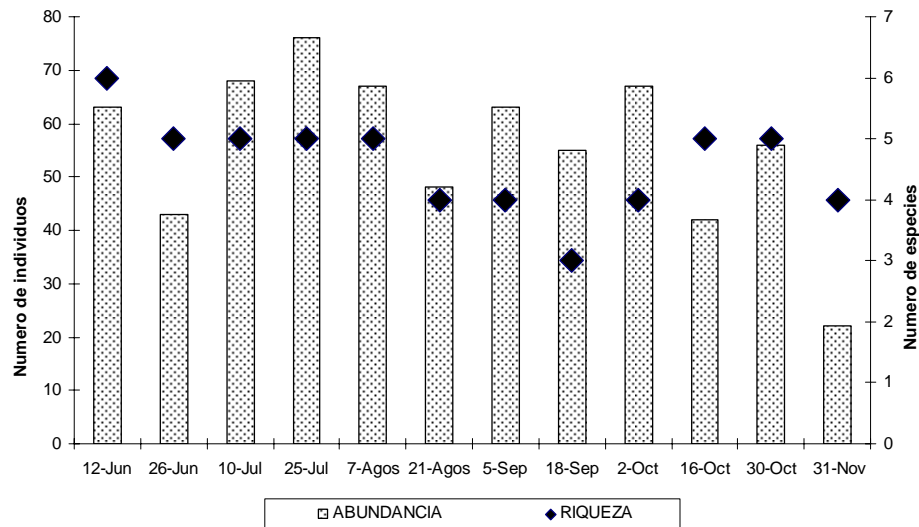


Figura 11. Variación temporal de la riqueza y abundancia de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Sierra Alta).

5.2.3.2 Análisis faunístico

Se encontraron tres especies superdominantes, cuatro dominantes y una no dominante. En relación a la abundancia, tres especies fueron muy abundantes, las otras cinco fueron raras. Al mismo tiempo para la frecuencia se encontraron tres muy frecuentes y cinco poco frecuentes. Finalmente tres especies fueron constantes y las otras cinco accidentales (Tabla 6).

Por medio del análisis faunístico se determinaron tres especies predominantes, las cuales fueron clasificadas como superdominantes (SD), muy abundantes (ma), muy frecuentes (MF) y constantes (c). Éstas especies fueron: *Apogonalia* spp., *A. pepino* y *Bothriocera* sp. Las especies *C. coffeacola*, *H. similis*, *A. pulchra* y *S. neloricatus*, fueron dominantes (D), raras (r), poco frecuentes (PF) y accidentales (Z). Finalmente, la especie *Achilidae* sp1 presentó unos índices similares a las tres anteriores, ésta sólo se diferenció en la dominancia ya que fue no dominante (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis faunístico de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Sierra Alta) durante junio a noviembre 2006.

| Familia | Especies | Total ⁽¹⁾ | D ⁽²⁾ | A ⁽³⁾ | F ⁽⁴⁾ | C ⁽⁵⁾ |
|--------------|---------------------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cicadellidae | | | | | | |
| | <i>Caribovia coffeacola</i> | 11 | D | r | PF | Z |
| | <i>Hortensia similis</i> | 14 | D | r | PF | Z |
| | <i>Apogonalia</i> spp. | 320 | SD | ma | MF | W |
| | <i>Agalliopsis pepino</i> | 153 | SD | ma | MF | W |
| | <i>Agallia pulchra</i> | 16 | D | r | PF | Z |
| | <i>Scaphytopius neloricatus</i> | 14 | D | r | PF | Z |
| Achilidae | | | | | | |
| | Achilidae sp1 | 1 | ND | r | PF | Z |
| Cixiidae | | | | | | |
| | <i>Bothriocera</i> sp. | 141 | SD | ma | MF | W |

Letras en negrilla representan las especies predominantes seleccionadas a través de los índices faunísticos.

⁽¹⁾ Total de individuos: colectadas en los 12 muestreos

⁽²⁾ Dominancia – SD: super dominante; D: dominante; ND: no dominante

⁽³⁾ Abundancia – r: rara; d: disperso; c: común; a: abundante; ma: muy abundante

⁽⁴⁾ Frecuencia – MF: muy frecuente; F: frecuente; PF: poco frecuente

⁽⁵⁾ Constancia – W: constante; Y: Accesorio; Z: Accidental

Con relación a las familias identificadas, se observó que Cicadellidae fue la más abundante con respecto al número de individuos, con 528 individuos que representan el 78.81% del total colectado. La segunda familia en importancia fue Cixiidae está reunió 141 individuos (21.04%), en contraste la familia Achilidae sólo representó el 0.15% (1 individuo) (Figura 12A). Se determinaron como especies representativas a: *Apogonalia* spp. (47.8%), *A. pepino* (22.8%) y *Bothriocera* sp. (21.0%), las cuales juntas componen el 91.6% del total de individuos (Figura 12B).

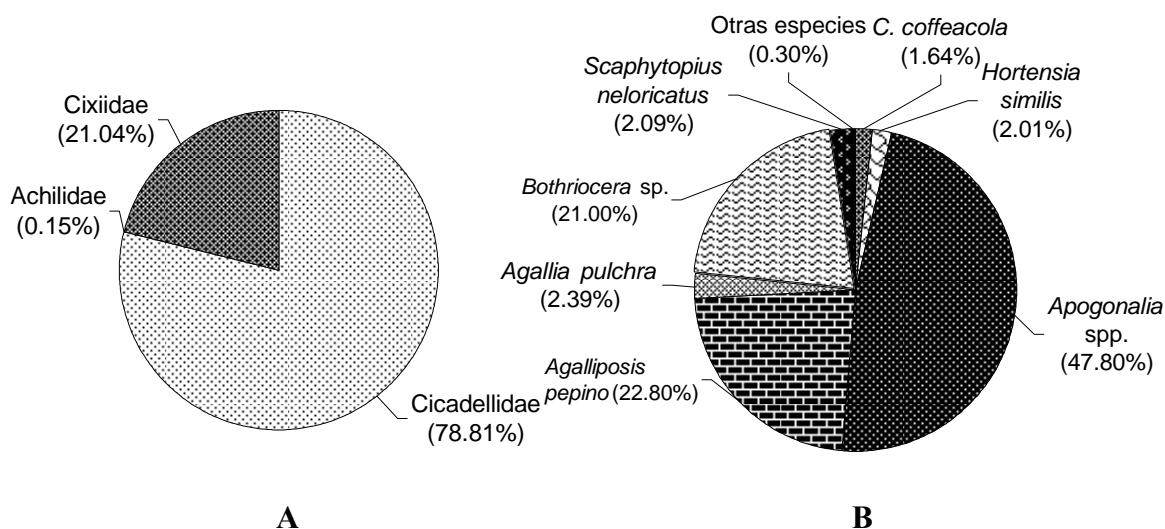


Figura 12. Frecuencia relativa de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en la finca de Yauco (Sierra Alta) durante junio a noviembre de 2006. Familias (A) , Especies (B).

5.3 Índices de biodiversidad

5.3.1 Biodiversidad α (diversidad de Shanon, Equidad y Dominancia)

Los valores de índice de diversidad de Shanon (H'), Equidad (J') y Dominancia D se presentan en la tabla 7. Se registraron diferencias significativas para cada uno de ellos ($p < 0.05$). A pesar que la riqueza de especies fue menor para las dos fincas localizadas en Yauco (Villa Cecilia y Sierra Alta), en éstas se registraron los mayores valores de diversidad y equidad y los menores de dominancia. Esto contrasta con lo observado para la finca en Adjuntas que a pesar de tener una alta riqueza de especies presentó el menor valor de diversidad y equidad y el mayor valor de dominancia. Un comportamiento similar fue observado en la finca localizada en Juana Díaz, bajo valor de diversidad y equidad, combinado con una alta dominancia.

Tabla 7. Total de individuos, riqueza, diversidad (H'), equidad (J') y dominancia (D) de especies (Hemiptera: Auchenorrhyncha) colectados en cuatro fincas de café, durante junio a noviembre de 2006.

| Fincas | Total colectado | Riqueza de especies | Diversidad | | Dominancia D ¹ |
|---------------|--------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | | Shanon- Wiener (H') ¹ | Equitatividad J' ¹ | |
| Adjuntas | 4931 | 10 | 0.37 A | 0.23 A | 0.84 C |
| Juana Díaz | 1185 | 11 | 0.86 B | 0.45 B | 0.61 B |
| Villa Cecilia | 637 | 9 | 1.11 C | 0.75 C | 0.39 A |
| Sierra Alta | 670 | 8 | 1.14 C | 0.77 C | 0.39 A |

^{1/} Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

5.3.2 Índices de biodiversidad β (Similaridad de Bray-Curtis).

La similitud mayor de especies de insectos Hemiptera: Auchenorrhyncha colectados a través de las trampas amarillas con pega, fue observada para la comparación entre las fincas ubicadas en Juana Díaz y Yauco (Villa Cecilia) valor de similaridad de Bray-Curtis de 0.515. De igual manera, las fincas que mostraron un menor índice de especies comunes fueron Adjuntas y Villa Cecilia (0.226) (Tabla 8).

Tabla 8. Índice de biodiversidad β de insectos (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de cuatro fincas de café durante junio a noviembre de 2006.

| Combinaciones | Similaridad (Bray-Curtis) |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Adjuntas – Juana Díaz | 0.369 |
| Adjuntas- Villa Cecilia | 0.226 |
| Adjuntas- Sierra Alta | 0.086 |
| Juana Díaz – Villa Cecilia | 0.515 |
| Juana Díaz – Sierra Alta | 0.237 |
| Villa Cecilia – Sierra Alta | 0.279 |

5.4 Muestreo, caracterización morfológica y quimiotáxonomica de colonias bacterianas presentes en las tres especies de insectos .

Todos los aislamientos realizados de los tejidos de las tres especies de insectos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* (*Caribovia coffeacola*, *Hortensia similis* y *Apogonalia* spp), resultaron en colonias bacterianas morfológica y bioquímicamente diferentes. El total de colonias aisladas fue de 178 (Anexos 5,6 y 7), de las cuales 81 (45.5%) se aislaron de tejidos de *H. similis*, 46 (25.8%) de *C. coffeacola* y 51 (28.7%) de *Apogonalia* spp., a su vez no se registraron diferencias significativas en cuanto al número de colonias por especie de insecto ($p > 0.05$) (Anexo 8). Respecto a tejido 77 (43.3%) fueron de la cabeza y 101 (66.7%) del cuerpo, en cuanto al tratamiento del tejido se encontraron diferencias significativas entre el número de colonias presentes para los tejidos desinfectados y sin desinfectar ($p < 0.05$) (Figura 13, Anexo 8); debido a que la desinfección reduce notablemente la flora bacteriana presente en cada uno de éstos; esta disminución se notó más en la cabeza de los insectos (Tabla 9).

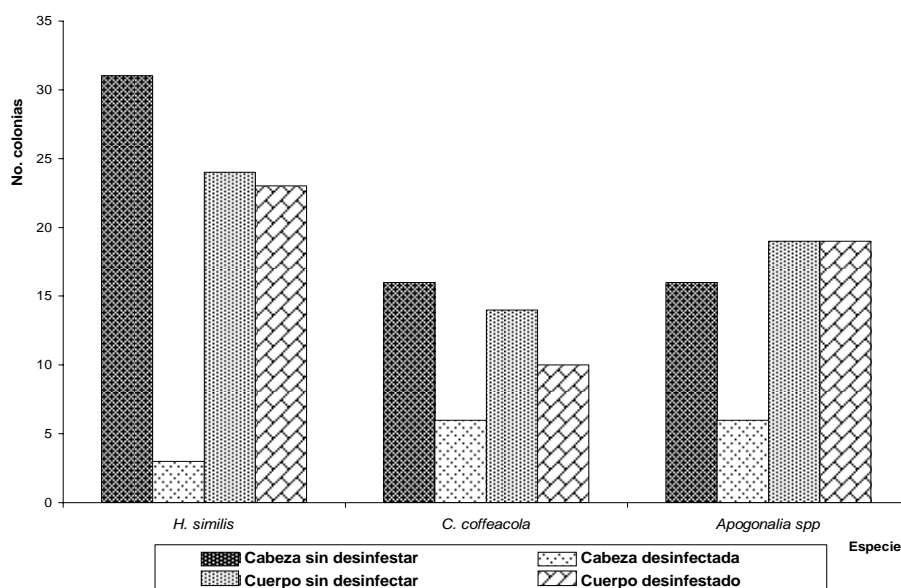


Figura 13. Distribución del número total de colonias de bacterias aisladas de tres especies de insectos por tejido y tratamiento.

Tabla 9. Número total de colonias bacterianas por especie de insecto, tejido de aislamiento y tratamiento.

| ESPECIE DE INSECTO | CABEZA ¹ | | CUERPO ² | | TOTAL |
|-----------------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|------------|
| | D ³ | S ⁴ | D ³ | S ⁴ | |
| <i>Apogonalia</i> spp. | 5 | 16 | 11 | 19 | 51 |
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 6 | 16 | 10 | 14 | 46 |
| <i>Hortensia similis</i> | 3 | 31 | 23 | 24 | 81 |
| TOTAL | 14 | 63 | 44 | 57 | 178 |

¹ Cabeza: Aparato bucal y parte de intestino anterior.

² Cuerpo: Cuerpo completo incluyendo la cabeza

³D: Tratamiento de tejido desinfectado

⁴S: Tratamiento de tejido sin desinfectar

En la respuesta a la tinción diferencial Gram, se observó que 82 (46.0%) de los aislados fueron Gram negativos y 96 (55.6%) Gram positivos. En cuanto a los tejidos con tratamientos de desinfección, se encontró un predominio de organismos Gram positivos, con excepción de aquellos provenientes del cuerpo desinfectado, donde se identificó un mayor número de organismos Gram negativos (Tabla 10).

Tabla 10. Número total de aislamientos bacterianos aislados de insectos agrupados por especie de insecto, tejido de aislamiento y respuesta a la tinción diferencial Gram.

| Especie de Insecto | CABEZA ¹ | | | | CUERPO ² | | | |
|-----------------------------|---------------------|----------|----------------|-----------|---------------------|-----------|----------------|-----------|
| | D ³ | | S ⁴ | | D ³ | | S ⁴ | |
| | Gram - | Gram + | Gram - | Gram + | Gram - | Gram + | Gram - | Gram + |
| <i>Apogonalia</i> spp. | 1 | 4 | 7 | 9 | 5 | 6 | 8 | 11 |
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 3 | 3 | 7 | 9 | 8 | 2 | 9 | 5 |
| <i>Hortensia similis</i> | 2 | 1 | 6 | 21 | 14 | 12 | 12 | 13 |
| TOTAL | 6 | 8 | 20 | 39 | 27 | 20 | 29 | 29 |

¹ Cabeza: Aparato bucal y parte de intestino anterior.

² Cuerpo: Cuerpo completo incluyendo la cabeza

³D: Tratamiento de tejido desinfectado

⁴S: Tratamiento de tejido sin desinfectar

En la prueba de oxidasa, 115 (64.6%) cepas respondieron de forma negativa a la prueba y 63 (35.4%) fueron positivas. Lo que indica que hay un predominio de organismos entéricos. En cuanto a la prueba de catalasa predominaron los organismos aeróbicos, debido a que 173 (97.2%) colonias fueron positivas y tan solo 5 (2.8%) fueron negativas (Tabla 11).

Tabla 11. Número total de cepas agrupadas por origen de insecto, tejido de aislamiento y respuesta quimiotaxónomica.

| Origen | N° Bacterias | Tejido ¹ | | Pruebas ² | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|---------------------|--------|----------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | | Cabeza | Cuerpo | Gram - | Gram + | Oxid. - | Oxid. + | Cata. - | Cata. + |
| <i>Apogonalia</i> spp. | 51 | 21 | 30 | 21 | 30 | 30 | 21 | 2 | 49 |
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 46 | 22 | 24 | 27 | 19 | 24 | 22 | 3 | 43 |
| <i>Hortensia similis</i> | 81 | 34 | 47 | 34 | 47 | 61 | 20 | 0 | 81 |
| Total | 178 | 77 | 101 | 82 | 96 | 115 | 63 | 5 | 173 |
| | | 43.3% | 56.7% | 46.1% | 53.9% | 64.6% | 35.4% | 2.8% | 97.2% |

¹ Tejido: Cabeza = Aparato bucal y parte intestino anterior; Cuerpo = Cuerpo completo incluyendo cabeza

² Pruebas: Gram = Tinción diferencial; Oxid = Oxidasa; Cata = Catalasa; - = negativo; + = positivo.

La combinación quimiotaxonómica con mayor frecuencia en los 178 aislamientos fue Gram positiva, oxidasa negativa y catalasa positiva, seguida de Gram negativa, oxidasa negativa y catalasa positiva. En el grupo de las bacterias Gram negativas por especie no se observó un patrón de combinación para todas las especies. En *Apogonalia* spp. hubo un número igual de bacterias Gram negativas, oxidasa negativa y catalasa positiva y Gram negativas, oxidasa positiva y catalasa positiva. Para *C. coffeacola* dominaron los Gram negativo, oxidasa positiva y catalasa positiva. En *H. similis* predominaron los organismos Gram negativo, oxidasa negativa y catalasa positiva. En ninguna de las especies se registró la combinación Gram negativo, oxidasa positiva y catalasa negativa (Figura 14). Por otra parte en los organismos Gram positivo para las tres especies predominó la combinación Gram positiva, oxidasa negativa y catalasa positiva, por el contrario se obtuvo un menor número de bacterias oxidasa positiva (Figura 15).

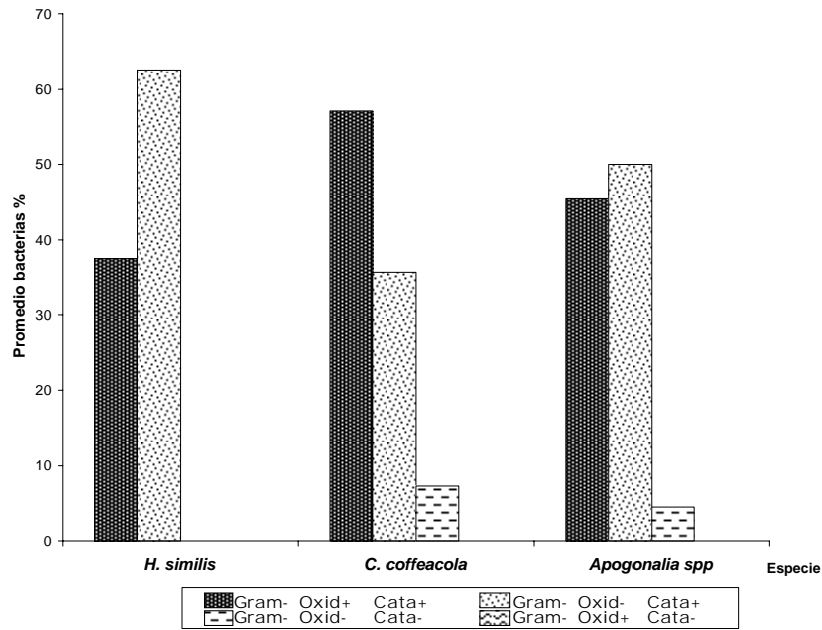


Figura 14. Frecuencia relativa de bacterias Gram negativas agrupadas por su respuesta bioquímica aisladas de tres especies de insectos.

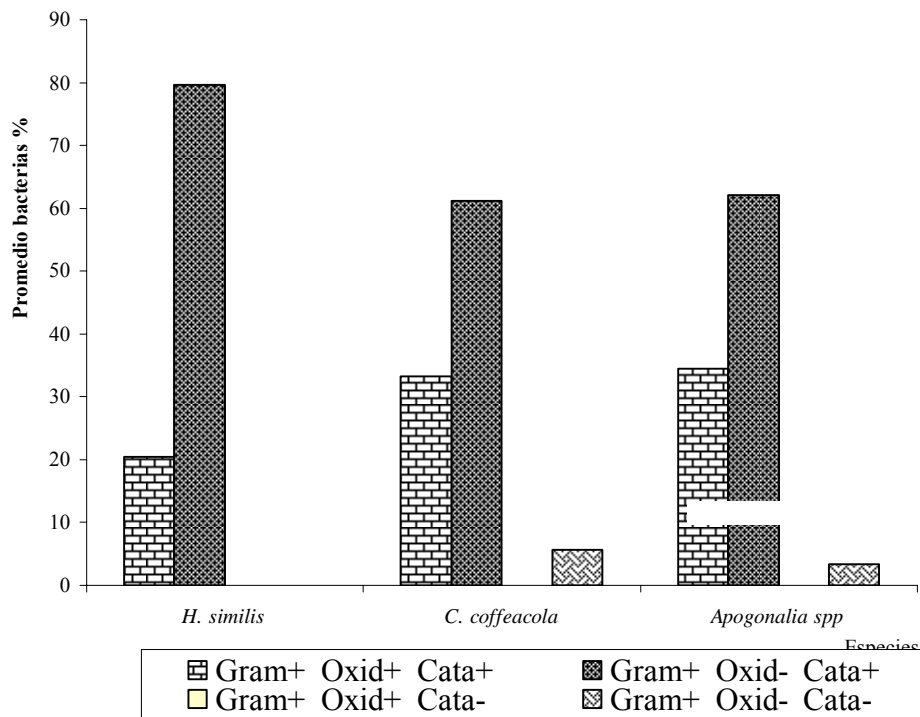


Figura 15. Frecuencia relativa de bacterias Gram positivas agrupadas por su respuesta bioquímica aisladas de tres especies de insectos.

Al agrupar los 178 aislamientos según su configuración morfológica se obtuvieron muchas combinaciones, lo que dificultó su análisis en forma global. A nivel celular se observaron cocos y bacilos en los dos grupos de organismos Gram. De los 178 aislamientos, 118 (66.3%) fueron bacilos y 60 (33.7%) cocos. En los dos grupos predominaron los organismos con forma bacilar, de igual manera, el mismo comportamiento se observó en los aislamientos por especie de insecto (Tabla 12).

Tabla 12. Morfología celular de bacterias aisladas de tres especies de insectos.

| Especie | Gram - | | Gram + | | Bacilos | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| | Cocos | Bacilos | Cocos | Bacilos | Sin esporas | Con esporas |
| <i>Apogonalia</i> spp. | 9 | 12 | 5 | 25 | 14 | 11 |
| <i>C. coffeacola</i> | 11 | 13 | 6 | 16 | 14 | 2 |
| <i>H. similis</i> | 14 | 23 | 15 | 32 | 26 | 6 |
| Total | 34 | 48 | 26 | 73 | 54 | 19 |

5.5 Identificación de desconocidos bacterianos provenientes de tejidos de insectos; mediante análisis de ácidos grasos (CG-FAME)

La identificación de las bacterias, mediante el análisis de ácidos grasos de 53 aislamientos, provenientes de tejidos de tres especies de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa* (21 de *H. similis*, 17 de *C. coffeacola* y 15 de *Apogonalia* spp), permitió ubicar a éstos en 19 géneros distribuidos en 30 especies (Anexo 9). Los géneros más representativos respecto al número de aislamientos ubicados dentro de ellos fueron: *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus* *Providencia*, *Pasteurella*, *Rhizobium* y *Vibrio* (Figura 16).

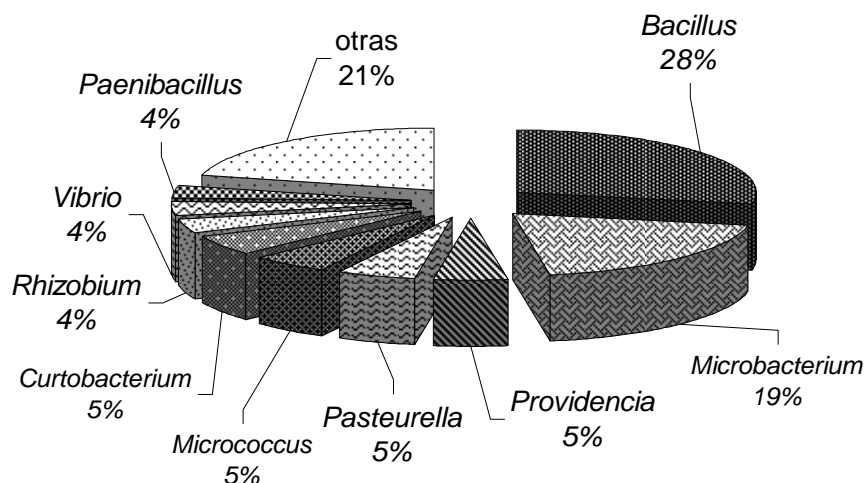


Figura 16. Frecuencia relativa de géneros bacterianos identificados mediante CG-FAME; aislados de tejidos de tres especies de insectos.

El análisis de la identificación de colonias presentes por especie de insecto y tejido de aislamiento se realizó a nivel de género bacteriano, debido a que al nivel de especie, en la mayoría de los casos, no se obtuvo un porcentaje de similaridad considerable. Para la distribución de éstas por insecto y tejido.

Se obtuvo un grupo de géneros en los que sólo se identificó uno de los desconocidos (Tabla 13); así como, otros con una mayor frecuencia de aislamiento (Tabla 14). A continuación, se detalla la distribución de los géneros predominantes por especie de insecto: Los 21 aislamientos provenientes de tejidos de *H. similis*, se ubicaron así: cuatro (19.0%) para *Bacillus*, seis (28.6%) para *Microbacterium*, dos (9.52%) para *Curtobacterium*, dos (9.52%) para *Paenibacillus* y uno (4.76%) para *Rhizobium*. En tanto, que los 20 aislamientos de *C. coffeacola* se distribuyeron en una mayor diversidad de géneros bacterianos representada por: cinco (25.0%) para *Microbacterium*, tres (15.0 %) para *Micrococcus*, tres (15.0%) para *Pasteurella*, tres

(15.0%) para *Providencia*, dos (10.0%) para *Vibrio*, uno (5.0%) para *Bacillus* y uno (5.0%) para *Curtobacterium*. Finalmente, para *Apogonalia* spp. los 15 aislamientos sólo estuvieron distribuidos dentro de dos géneros, así: 11 (73.3%) para *Bacillus* y 1 (6.7%) para *Rhizobium*.

El género *Bacillus* se observó como el único común en las tres especies de insectos, en tanto que, los géneros *Curtobacterium* y *Microbacterium* se determinaron en *H. similis* y *C. coffeacola*, *Rhizobium* se aisló de *H. similis* y *Apogonalia* spp. solamente. Por otra parte, se pudo reconocer algunos géneros como únicos para cada una de las especies de insectos, esto se realizó combinando la distribución de los géneros predominantes que no se distinguieron como comunes, con aquellos en los que solo se identificó uno de los aislamientos. Únicos de *H. similis* resultaron: *Brevundimonas*, *Clavibacter*, *Kokuria*, *Pantoea*, *Nocardia* y *Paenibacillus*. Únicos de *C. coffeacola* resultaron: *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Pasteurella*, *Providencia* y *Vibrio*. Únicos de *Apogonalia* spp resultaron: *Chryseobacterium*, *Kluyvera* y *Pseudomonas*.

Tabla 13. Aislamientos bacterianos de diferentes tejidos de tres especies de insectos identificados por medio del análisis de ácidos grasos.

| No. Bacter. | Especie de Insecto | Tejido de aislamiento | Identificación ¹ | Probabilidad (%) ² |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 3926 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Pectobacterium carotovorum</i> | 77.4 |
| 4079 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Clavibacter michiganensis</i> | 52.6 |
| 4099 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Kocuria kristinae</i> | 86.6 |
| 4082 | <i>H. similis</i> | Cabeza desinfectada | <i>Pantoea ananatis</i> | 72.9 |
| 4100 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfectar | <i>Nocardia farcinica</i> | 61.9 |
| 4113 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Brevundimonas vesicularis</i> | 94.1 |
| 4125 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Acinetobacter calcoacetais</i> | 57.5 |
| 4179 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfectar | <i>Chryseobacterium balustinum</i> | 73.1 |
| 4170 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfectar | <i>Pseudomonas putida</i> | 54.9 |
| 4173 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfectar | <i>Kluyvera cryocrescens</i> | 77.2 |

¹ Identificación mediante análisis de ácidos grasos.

² Probabilidad dada por el análisis de ácidos grasos.

Tabla 14. Distribución por tejido y tratamiento de las bacterias predominantes aisladas de tres especies de insectos.

| Género bacteriano | <i>Hortensia similis</i> | | | | <i>Caribovia coffeacola</i> | | | | <i>Apogonalia spp.</i> | | | | Total |
|-----------------------|--------------------------|----------------|---------------------|----------------|-----------------------------|----------------|---------------------|----------------|------------------------|----------------|---------------------|----------------|-------|
| | Cabeza ¹ | | Cuerpo ² | | Cabeza ¹ | | Cuerpo ² | | Cabeza ¹ | | Cuerpo ² | | |
| | S ³ | D ⁴ | S ³ | D ⁴ | S ³ | D ⁴ | S ³ | D ⁴ | S ³ | D ⁴ | S ³ | D ⁴ | |
| <i>Bacillus</i> | - | - | 3 | 1 | - | - | - | 1 | 3 | 1 | 3 | 4 | 16 |
| <i>Microbacterium</i> | 3 | - | 1 | 2 | 1 | - | 3 | 1 | - | - | - | - | 11 |
| <i>Providencia</i> | - | - | - | - | - | 1 | - | 2 | - | - | - | - | 3 |
| <i>Pasteurella</i> | - | - | - | - | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | 3 |
| <i>Micrococcus</i> | - | - | - | - | - | 3 | - | - | - | - | - | - | 3 |
| <i>Curtobacterium</i> | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 3 |
| <i>Rhizobium</i> | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 |
| <i>Vibrio</i> | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | 2 |
| <i>Paenibacillus</i> | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |

¹ Cabeza: Aparato bucal y parte intestino anterior..

² Cuerpo: Cuerpo completo incluyendo la cabeza

³S Tratamiento de tejido sin desinfestar

⁴D: Tratamiento de tejido desinfestado

5.5.1 Análisis estadístico

De acuerdo al análisis de conglomerados, el algoritmo de agrupamiento de mejor correlación cofenética fue el de encadenamiento completo que mostró un valor de 0.956. Éste explica el agrupamiento de los géneros bacterianos por tejido y tratamiento. En la figura 17 se observa el dendograma generado, el corte se realizó a una distancia de 1.5 y se obtuvieron 7 conglomerados. En la tabla 15, se pueden observar los géneros agrupados, con su tejido y tratamiento.

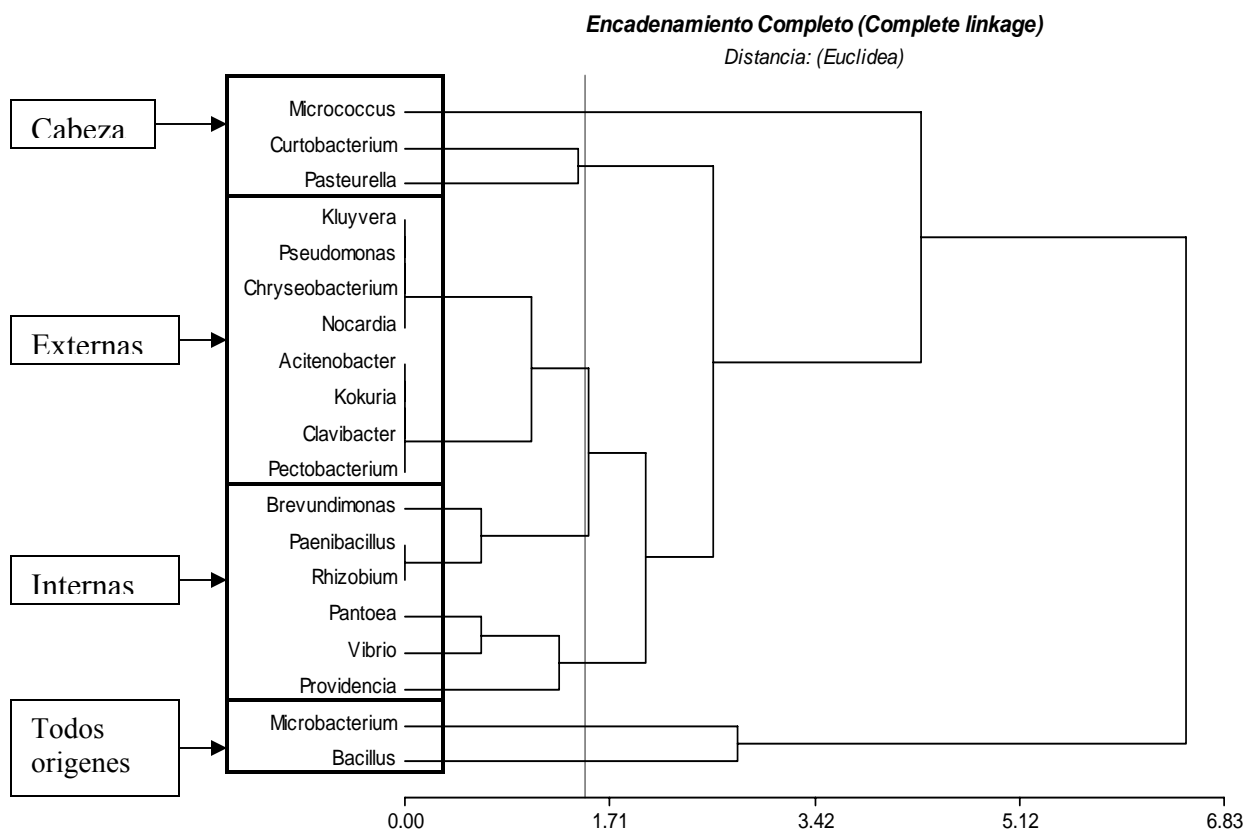


Figura 17. Dendograma generado con los géneros bacterianos aislados de tres especies de insectos, agrupados por origen de tejido.

Tabla 15. Conglomerados generados mediante el algoritmo de encadenamiento completo

| Conglomerado | Género | Nicho ¹ | Tejido/ Tratamiento | | | |
|--------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | | C/S ² | C/D ³ | CU/S ⁴ | CU/D ⁵ |
| 1 | <i>Bacillus</i> | I,E | 3 | 1 | 6 | 6 |
| 2 | <i>Microbacterium</i> | I,E | 4 | - | 4 | 3 |
| 3 | <i>Pantoea</i> | I | - | 1 | - | - |
| | <i>Providencia</i> | I | - | 1 | - | 2 |
| | <i>Vibrio</i> | I | - | 1 | - | 1 |
| 4 | <i>Brevundimonas</i> | I | - | - | - | 1 |
| | <i>Paenibacillus</i> | I | - | - | - | 2 |
| | <i>Rhizobium</i> | I | - | - | - | 2 |
| 5 | <i>Acinetobacter</i> | E | 1 | - | - | - |
| | <i>Clavibacter</i> | E | 1- | - | - | - |
| | <i>Chryseobacterium</i> | E | - | - | 1 | - |
| | <i>Kluyvera</i> | E | - | - | 1 | - |
| | <i>Kokuria</i> | E | 1 | - | - | - |
| | <i>Nocardia</i> | E | - | - | 1 | - |
| | <i>Pectobacterium</i> | E | 1 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> | E | - | - | 1 | - | |
| 6 | <i>Curtobacterium</i> | I | 1 | - | 1 | - |
| | <i>Pasteurella</i> | I | 2 | 1 | - | - |
| 7 | <i>Micrococcus</i> | I | - | 3 | - | - |

¹ Nicho: I= Origen interno (Tejido desinfectado); E = Origen externo (tejido sin desinfectar).

²C/S: Tratamiento Cabeza sin desinfectar ³C/D: Tratamiento Cabeza desinfectada

⁴CU/S: Tratamiento Cuerpo sin desinfectar ⁵CU/D: Tratamiento Cuerpo desinfectado

En el conglomerado 1, sólo se encontró el género *Bacillus*, el cual se presentó en todos los tejidos y tratamientos, ya que ésta bacteria estuvo presente tanto a nivel externo e interno en los tejidos. En el conglomerado 2, se ubicó el género *Microbacterium*, al

igual que el *Bacillus* se presentó en la mayoría de los tejidos con excepción de la cabeza desinfectada.

En el conglomerado 3, se agruparon los géneros *Pantoea*, *Providencia* y *Vibrio*, lo cual presenta géneros que se aislaron de cuerpo desinfectado y/o cabeza desinfectada. El conglomerado 4, reunió los géneros *Brevundimonas*, *Paenibacillus* y *Rhizobium*, éstos tres se obtuvieron del cuerpo desinfectado. Por lo tanto, los conglomerados 3 y 4, agruparon las bacterias presentes internamente en los insectos.

El conglomerado 5, incorporó a los géneros provenientes de los tejidos sin desinfectar, dentro de los que se encuentran *Acinetobacter*, *Clavibacter*, *Kokuria* y *Pectobacterium*, éstos aislados de la cabeza sin desinfectar, a su vez estuvieron presentes los géneros *Chryseobacterium*, *Kluyvera*, *Nocardia* y *Pseudomonas*, observados en el cuerpo sin desinfectar. Las bacterias presentes en éste conglomerado se pueden considerar como aquellas presentes a nivel externo en los insectos.

El conglomerado 6, agrupó los géneros *Curtobacterium* y *Pasteurella*, en éstos dos se encontraron aislamientos provenientes de la cabeza sin desinfectar. En el conglomerado 7, sólo se ubicó el género *Micrococcus*, provenientes de aislamientos de la cabeza desinfectada, por tanto podría considerarse a este como el único género presente en el aparato bucal y parte del intestino anterior de los insectos.

5.7 Prueba con ELISA

Esta prueba es determinada como positiva cuando luego de agregar la peroxidasa aparece un color azul intenso en la fosa, este puede aparecer de forma inmediata o al cabo

de 30 minutos como tiempo máximo. Todos los aislamientos caracterizados como Gram negativos, con forma de bacilo, provenientes de los tejidos de los insectos y plantas, se probaron en tres ensayos mediante la prueba pathoscreen- Xf (Anexo 10). De los ensayos realizados se obtuvo resultado positivo en el primero, con cuatro provenientes de tejidos de los insectos *Hortensia similis* y *Caribovia coffeacola*. Pero este resultado no se logró confirmar en los dos ensayos posteriores. De igual manera, en la caracterización mediante ácidos grasos (CG-FAME) se identificaron en géneros diferentes a Xf (Tabla 16).

Tabla 16. Características e identificación mediante (CG-FAME) de cuatro aislamientos considerados de forma preliminar como positivos mediante la prueba de ELISA.

| No. | Especie de insecto | Origen ¹ | Días | Color | Morfología celular | Identidad CG-FAME |
|------|----------------------|---------------------|------|----------|--------------------|-----------------------|
| 4011 | <i>H. similis</i> | Cu/D | 7 | Amarillo | Bacilos | <i>Microbacterium</i> |
| 4028 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | 7 | Crema | Bacilos | <i>Providencia</i> |
| 4029 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | 7 | Blanco | Bacilos | <i>Providencia</i> |
| 4030 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | 2 | Crema | Bacilos | <i>Providencia</i> |

¹ Origen: Tejido y tratamiento de aislamiento: C/D = Cuerpo completo incluyendo la cabeza, desinfectado. Cu/S = Cuerpo completo incluyendo la cabeza, sin desinfectar.

5.8 Muestreo, caracterización morfológica y quimiotaxónomica de colonias bacterianas presentes en café.

En todos los aislamientos realizados en plantas de café de las cuatro fincas, se observó la presencia de bacterias, con un total de 68 colonias (Anexo 11). Éstas se distribuyeron por finca: 23 (33.8%) de Villa Cecilia; 11 (16.2%) de Sierra Alta, 17 (25%) de Juana Díaz y 17 (25%) de Adjuntas. A su vez, se caracterizaron 32 (47.1%) de las bacterias como Gram negativas y 36 (52.9%) Gram positivas. En las fincas localizadas en Yauco (Villa Cecilia y Sierra Alta) se registró un mayor número de organismos Gram

negativos, en tanto que para Adjuntas y Juana Díaz predominaron los Gram positivos (Figura 18). Lo que sugiere una mayor probabilidad de identificar algunos organismos patógenos en los cultivos obtenidos de Yauco, ya que la mayoría de bacterias fitopatógenas son Gram negativas (Hayward, 1983).

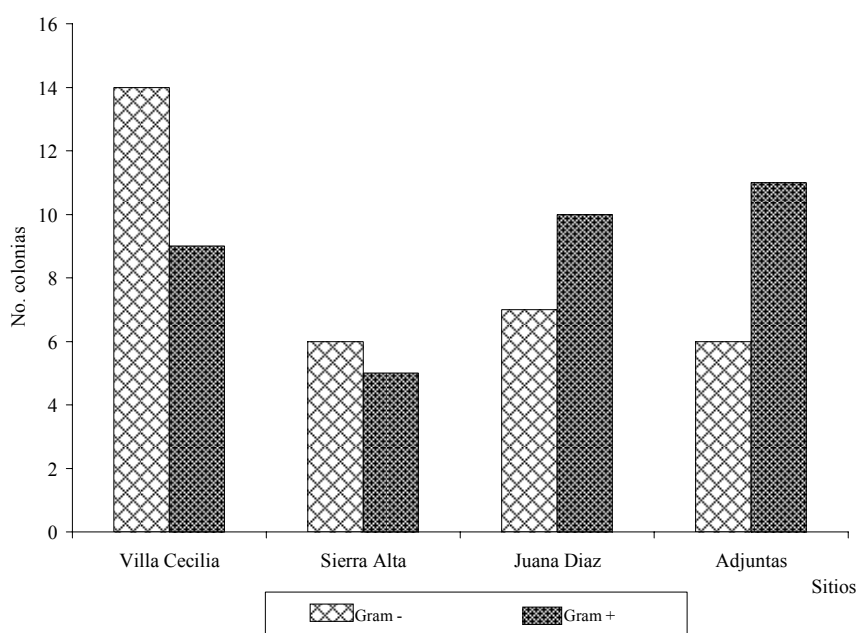


Figura 18. Distribución de bacterias aisladas de café agrupadas por lugar de muestreo y respuesta Gram

Con respecto a la caracterización bioquímica, se encontró que 39 (57.4%) de las bacterias respondieron de forma negativa a la prueba de oxidasa y 29 (42.6%) positiva; básicamente estas últimas corresponde a organismos no entéricos. Asimismo, en la prueba de catalasa, se observó un predominio de organismos aeróbicos, ya que 64 (94.1) de las bacterias dieron positivo y 4 (5.9%) negativa (Tabla 17).

Tabla 17. Número total de bacterias por localidad y respuesta quimiotaxónomica.

| Localidad | N° Bacterias | Pruebas | | | | | |
|-------------------|-----------------|-----------|-----------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| | | Gram - | Gram + | Oxidasa - | Oxidasa + | Catalasa - | Catalasa + |
| Villa Cecilia | 23 | 14 | 9 | 12 | 11 | 0 | 23 |
| Sierra Alta | 11 | 6 | 5 | 8 | 3 | 1 | 10 |
| Juana Díaz | 17 | 7 | 10 | 11 | 6 | 2 | 15 |
| Adjuntas | 17 | 6 | 11 | 8 | 9 | 1 | 16 |
| Total/ | 68 | 33 | 35 | 39 | 29 | 4 | 64 |
| Porcentaje | | (48.5%) | (51.5%) | (57.4%) | (42.6%) | (5.9%) | (94.1%) |

Leyenda: + reacción positiva, - reacción negativa.

La combinación quimiotaxónomica con mayor frecuencia en los 68 aislamientos fue Gram positiva, oxidasa negativa y catalasa positiva, seguida de Gram negativa, oxidasa positiva y catalasa positiva. En el grupo de las bacterias Gram negativas por finca se observó, que para Villa Cecilia, predominaron los organismos Gram negativos, oxidasa positiva y catalasa positiva (Figura 19). Mientras que en las otras tres, se registró un número similar de bacterias Gram negativas, oxidasa positiva y catalasa positiva y Gram negativas, oxidasa negativa y catalasa positiva. Por otra parte, para las bacterias Gram positivas en todas las fincas, abundaron aquellos Gram positivos, oxidasa negativa y catalasa positiva (Figura 20).

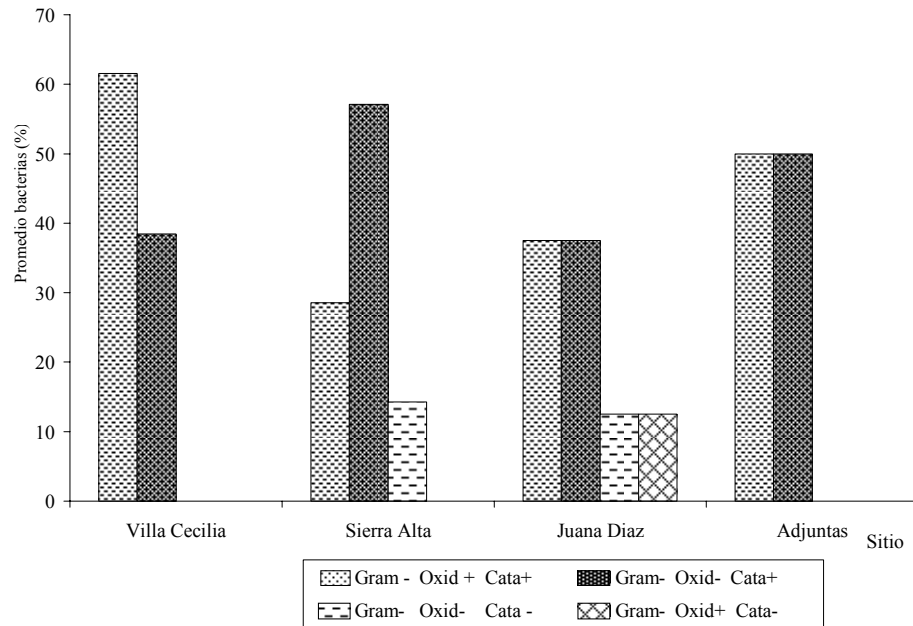


Figura 19. Frecuencia relativa de bacterias Gram negativas de café agrupadas por su respuesta bioquímica.

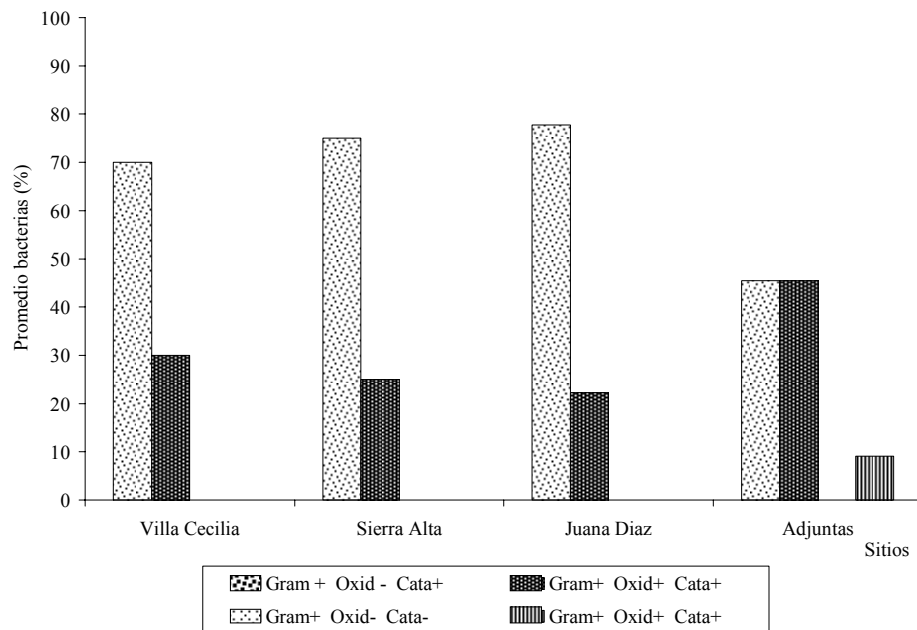


Figura 20. Frecuencia relativa de bacterias Gram positivas de café agrupadas por su respuesta bioquímica.

Al agrupar los 68 aislamientos según su configuración morfológica se obtuvieron muchas combinaciones, que dificultó su análisis; debido a esto, se separaron en dos grupos según su respuesta Gram, obteniéndose grupos con características compartidas. En el grupo de las Gram negativas predominó la coloración amarilla con 15 bacterias (45.5%), de bordes ondulados y enteros, mientras que, la configuración fue muy variada, de elevación mayormente plana. Por otra parte, en las Gram positivas, se encontró 16 (41.7%) de color blanco y 12 (33.3%) de color amarillo, la configuración más común fue redonda, con margen ondulado y elevada (Anexo 11).

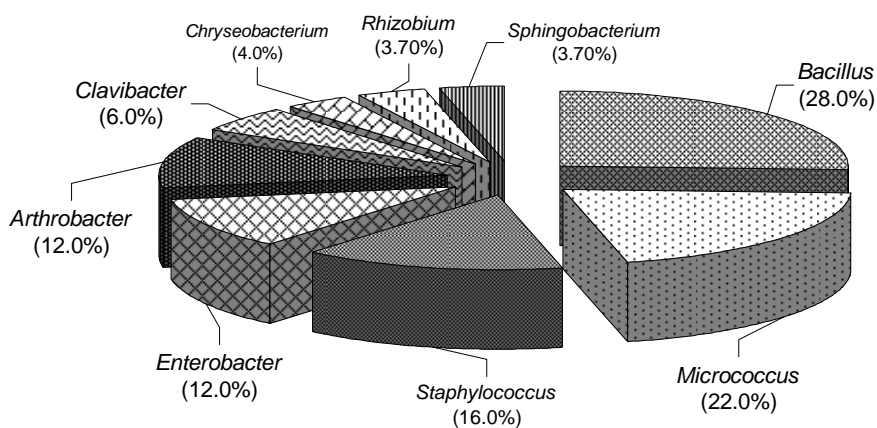
A nivel celular se observaron cocos y bacilos en los dos grupos de organismos Gram. De los 68 aislamientos, 48 (70.6%) fueron bacilos y 20 (29.4%) cocos. En los dos grupos se observó un predominio de las células de forma bacilar, pero, al comparar la morfología presentada por finca, el comportamiento fue igual que el anterior, excepto para Juana Díaz, donde para el grupo de los organismos Gram positivos, se determinó un mayor número de cocos (Tabla 18).

Tabla 18. Morfología celular de bacterias aisladas de plantas de café.

| Localidad | Gram - | | Gram + | | Bacilos | |
|-----------------------|--------|---------|--------|---------|-------------|-------------|
| | Cocos | Bacilos | Cocos | Bacilos | Sin esporas | Con esporas |
| Adjuntas | 3 | 3 | 3 | 8 | 3 | 5 |
| Juana Díaz | 3 | 5 | 6 | 3 | 0 | 3 |
| Yauco (Villa Cecilia) | 2 | 9 | 2 | 10 | 4 | 6 |
| Yauco (Sierra Alta) | 0 | 7 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| Total | 8 | 24 | 12 | 24 | 9 | 15 |

5.9 Identificación de desconocidos bacterianos obtenidos de café.

A partir de los aislamientos bacterianos provenientes de los tejidos vegetales de las plantas de café, se formaron 12 grupos los cuales tenían características morfológicas y quimiotaxónomicas comunes (Anexo 12), de estos se lograron identificar mediante el sistema BIOLOG® a 10 de ellos (Anexo 13), en los cuales se ubicaron a 54 de los 68 aislamientos, dichos géneros fueron: *Bacillus* (14), *Micrococcus* (11), *Staphylococcus* (8), *Enterobacter* (6), *Arthrobacter* (6), *Chryseobacterium* (3), *Clavibacter* (2), *Rhizobium* (2) y *Sphingobacterium* (2) (Figura 21).



n= 54

Figura 21. Frecuencia relativa de géneros bacterianos aislados de café según el sistema BIOLOG®.

5.8.1 Distribución de géneros bacterianos por finca de muestreo

De acuerdo a la frecuencia de aislamiento se determinó a los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* como los más representativos, a su vez estos tres estuvieron presentes en las cuatro fincas de muestreo. La distribución de la diversidad bacteriana identificada en los tejidos vegetales permitió determinar: a 13 de los aislamientos obtenidos de plantas en la finca de Villa Cecilia (Yauco), dentro de ocho géneros, de los cuales se determinó a 4 (30.8%) de ellos como *Bacillus* y 3 (23.1%) como *Enterobacter* siendo éstos dos los más abundantes, de igual manera se identificaron los géneros: *Arthrobacter* (2), *Clavibacter* (2), *Micrococcus* (1), *Rhizobium* (2), *Sphingobacterium* (1) y *Staphylococcus* (2) (Figura 22).

Se logró agrupar a siete de los aislamientos de la finca de Sierra Alta (Yauco) en cinco géneros: *Micrococcus* y *Chryseobacterium* con dos (28.6%) aislamientos para cada uno, los tres aislamientos restantes se identificaron como: *Bacillus*, *Enterobacter* y *Staphylococcus*.

En Juana Díaz, los 14 aislamientos determinados se agruparon en cinco géneros: *Micrococcus* con cinco (35.10%) de los aislamientos y *Bacillus* con cuatro (28.6%), *Arthrobacter* (2), *Sphingobacterium* (1) y *Staphylococcus* (3) (Figura 22).

Por último, en Adjuntas los 16 aislamientos determinados se agruparon en seis géneros, *Bacillus* cinco (31.3%), *Micrococcus* y *Staphylococcus* con tres (25.0%) organismos cada uno, *Arthobacter* (2), *Clavibacter* (1) y *Enterobacter* (2) (Figura 22).

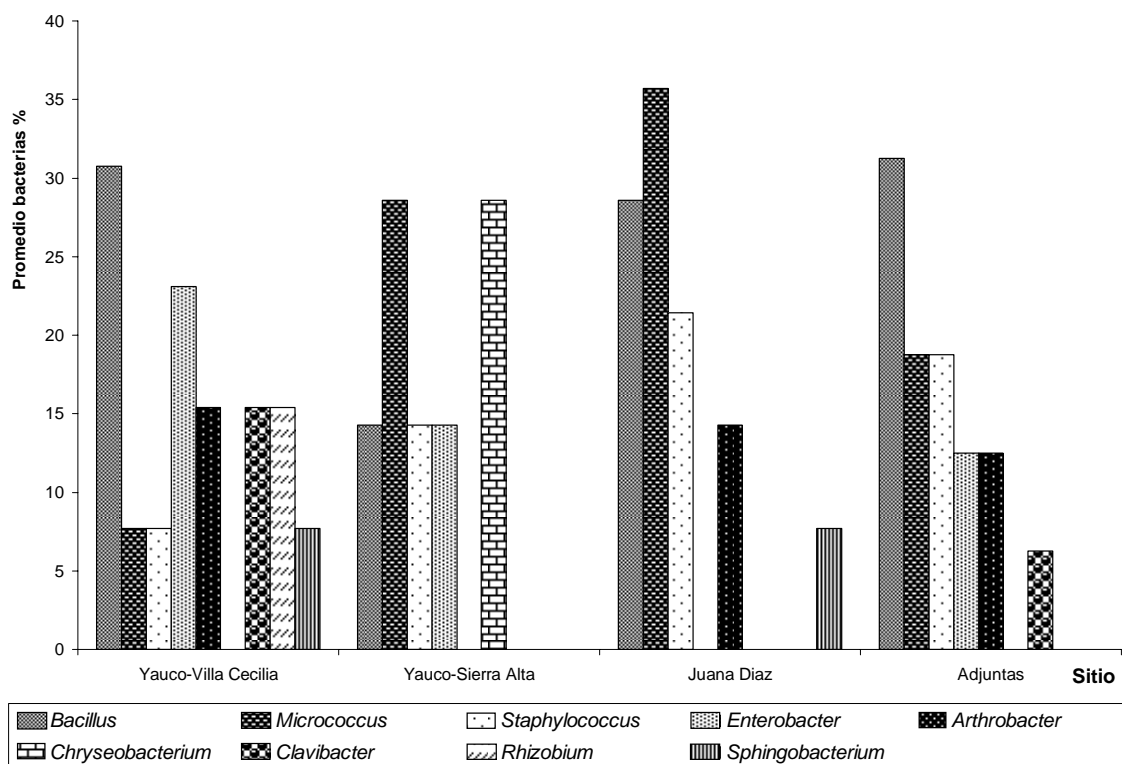


Figura 22. Frecuencia relativa de géneros bacterianos aislados de café.

5.9 Géneros bacterianos comunes en tejidos de insectos y plantas.

De los 19 géneros bacterianos identificados de los tejidos de los insectos y los 9 de los tejidos de las plantas. Sólo se encontraron cinco géneros comunes en éstos dos: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Micrococcus* y *Rhizobium* (Tabla 19).

Tabla 19. Comparación de diversidad bacteriana en tejidos de insectos y plantas.

| Origen | Tejidos de Insectos | | Tejidos de Plantas | |
|--------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| | Origen | Género | Frecuencia de aislamiento | Género |
| Cabeza | | <i>Curtobacterium</i> | Mayor frecuencia | <i>Bacillus</i> |
| | | <i>Micrococcus</i> | | <i>Micrococcus</i> |
| | | <i>Providencia</i> | | <i>Staphylococcus</i> |
| | | <i>Brevundimonas</i> | | |
| | | <i>Paenibacillus</i> | | |
| Internas | | <i>Pantoea</i> | Menor frecuencia | |
| | | <i>Providencia</i> | | |
| | | <i>Vibrio</i> | | <i>Arthrobacter</i> |
| | | <i>Rhizobium</i> | | <i>Enterobacter</i> |
| | | <i>Acitenobacter</i> | | <i>Clavibacter</i> |
| | | <i>Chryseobacterium</i> | | <i>Chryseobacterium</i> |
| | | <i>Clavibacter</i> | | <i>Rhizobium</i> |
| Externas | | <i>Kluyvera</i> | | <i>Sphingobacterium</i> |
| | | <i>Kokuria</i> | | |
| | | <i>Nocardia</i> | | |
| | | <i>Pectobacterium</i> | | |
| | | <i>Pseudomonas</i> | | |
| Todos los orígenes | | <i>Bacillus</i> | | |
| | | <i>Microbacterium</i> | | |

6. DISCUSIÓN

6.1 Composición y riqueza de insectos en cuatro fincas de café de tres localidades de Puerto Rico.

La bacteria *Xylella fastidiosa* sólo puede ser transmitida por insectos que se alimentan del xilema de las plantas, éstos se ubican principalmente dentro de las familias Cicadellidae y Cercopidae (Hopkins, 1989; Lopes, 1996; Almeida y Purcell, 2003; Redak et al, 2004, Brodbeck et al., 2006). Para este estudio, dentro de las familias reportadas con insectos vectores de la bacteria, únicamente se colectaron individuos dentro de la familia Cicadellidae, los cuales se consideraron, como vectores potenciales. Asimismo, ésta familia se reconoció como las más representativa en cuanto al número de especies (66.67%) e individuos (91.72%). Dichos resultados concuerdan con lo observado en varias investigaciones para identificar insectos vectores en cultivos de café y cítricos. Dentro de estos se pueden mencionar a Rojas et al., (2001); Garita et al., (2005) y Godoy et al., (2005) en zonas cafeteras de Costa Rica, Menequim et al., (2001) para café en Brasil, Yamamoto y Gravena, (2000); Marucci et al., (2002); Yamamoto et al., (2002) y Pedreira, (2003) para cítricos en Brasil.

Al cotejar los resultados de la riqueza de especies de la familia Cicadellidae observadas en éste estudio (8 especies), con lo reportado por Brodbeck et al., (2006) para plantas de cítricos y café (6 especies), se puede inferir que dicha riqueza para Puerto Rico es inferior, al compararla con la de otros países tropicales. Se pueden mencionar, los trabajos en zonas cafeteras de Costa Rica, donde, Rojas et al, (2001) y Godoy et al,

(2005), observaron 82 y 10 especies de cicadélidos, respectivamente. En Brasil se han evaluado los vectores en café y cítricos; en plantas de café Menequim et al, (2001) determinaron 84 especies, mientras que en plantas de cítricos, se observaron 45 especies por Yamamoto y Gravena, (2000); 64 especies por Hickel et al., (2001); 16 especies por Marucci et al, (2002), 54 especies por Pedreira, 2003. El menor número de especies presentes se puede explicar, al observar los datos del catastro sobre diversidad de cicadélidos neotropicales realizado por Freitag y Galani, (2002). En esta investigación se informan para Puerto Rico 13 especies, lo que significa el lugar 20 a este nivel, comparado con Brasil que ocupa el primer lugar con 120 especies y Costa Rica, el tercer lugar con 89 especies descritas.

Igualmente dentro de las especies de insectos colectados, durante esta investigación, se observó a *Caribovia coffeacola*, como dominante en tres de los cuatro sitios (Adjuntas, Juana Díaz y Yauco-Villa Cecilia), excepto en Yauco-Sierra Alta, donde dominó *Apogonalia* spp.. En las investigaciones de Brodbeck y Andersen, (2006); Brodbeck et al, (2006), se reportó a *C. coffeacola* alimentándose directamente de las plantas; en tanto, que *Apogonalia* spp. sólo se halló en la vegetación rastrera presente en las fincas muestreadas. El hecho de encontrar a ésta especie en las plantas de café de Yauco-Sierra Alta, indica que éste al igual que *Caribovia* podría alimentarse del café. Estas dos especies podrían desempeñar un papel importante, en la diseminación de la bacteria en los cafetales de Puerto Rico, debido a que una alta abundancia unida a que los insectos se alimenten de las plantas, son dos características importantes para

considerarlas vectores potenciales de *X. fastidiosa* (Purcell, 1994 citado por Pedreira, 2003).

De las especies reportadas como vectores de *X. fastidiosa*, únicamente se colectó a *Hortensia similis* (Mizzell et al., 2003; Purcell, 2005; Redak et al., 2004), dicha especie se determinó como de ocurrencia accidental en las planta de café (colectada con trampas amarillas) para las cuatro fincas de muestreo, esta misma distribución ha sido reportada en otros estudios (Beltrán et al., 2004; Yamamoto et al., 2002; Pedreira, 2003). A su vez dicha especie se observó como predominante en los barridos realizados en la vegetación rastrera presente, ésto coincide con lo descrito por Yamamoto y Gravena, (2000); Marucci et al., (2002). Estas dos observaciones indican que la fuente de alimentación primaria para ésta especie, la constituye la vegetación rastrera y sólo ocasionalmente se alimenta de las plantas arbóreas (Brodbeck y Andersen, 2006). Asimismo, dicho comportamiento es reafirmado con la investigación de Ott et al. (2006); al evaluar la presencia de cicadélidos en la vegetación rastrera asociada al cultivo de cítricos en Brasil, donde dicha especie se determinó como constante. Desde este punto de vista podría considerarse como vector potencial para las plantas de café en Puerto Rico, dado que se observó alimentándose de las plantas y es abundante en la vegetación rastrera presente dentro del cultivo.

El hecho de encontrar a *H. similis* con una alta abundancia en la vegetación rastrera presente es relevante para la diseminación de la bacteria, Lopes et al, (2003) encontraron que *X. fastidiosa* puede estar presente de forma asintomática en una variedad de malezas presentes en cultivos de cítricos, café y ciruela. Lo que convierte a

éstas como una fuente primaria de inóculo para la adquisición por parte de los insectos que se alimentan de ellas, y su posterior diseminación en las plantas de importancia económica.

A su vez *H. similis* se determinó como la única especie que fue común a las colectadas en otras investigaciones sobre identificación de insectos vectores (Hickel et al., 2001; Yamamoto y Gravena, 2000; Godoy et al., 2005; Pedreira, 2003, Beltrán et al., 2004). Dicha observación se debe a que esta especie es identificada con una abundante distribución en el trópico, Maes y Godoy, (1993); informan que ha sido reportada en Estados Unidos, México, Puerto Rico, Nicaragua, Panamá, Antillas, Cuba, Colombia, Venezuela, Guayana, Perú, Ecuador, Bolivia, Brasil, Paraguay y Argentina. El primer reporte para Puerto Rico fue realizado por Ramos, 1957; además posee un amplio rango de plantas hospederas, tanto de importancia económica como en malezas o plantas de bajo crecimiento (Cadwell y Martorell, 1952; Martorell, 1976).

Las especies *Agalliopsis pepino* y *Agallia pulchra* estuvieron presentes en las cuatro sitios de muestreo, a su vez estas son de importancia para este estudio dado su abundancia en las fincas localizadas en Yauco. *Agalliopsis pepino* se determinó como dominante en la finca de Yauco-Sierra Alta, en tanto que *Agallia pulchra* lo fue para Yauco-Villa Cecilia. Al analizar estas dos características abundancia y que se alimenten de las plantas, al igual que *Caribovia* y *Apogonalia* podrían considerarse como vectores potenciales, de igual manera, algunas especies del género *Agallia* han sido colectadas en plantas de cítricos y en la vegetación rastrera presente en dichos cultivos (Hickel et al., 2001; Yamamoto y Gravena, 2000), mediante una prueba de ELISA detectó la presencia

de *X. fastidiosa* en éstos (Hickel et al., 2001). Además, algunas especies de este género han sido reportadas como vectores de virus de importancia agrícola, tales como: “Brazilian curly top” del tomate (Sauer, 1941), “yellow dwarf” de la papa (PYDV) Black, 1944), “wound-tumor” del trébol (Black, 1944) En: Coll et al., 1998b; asimismo la especie *Agallia constricta*, es el vector del “wound tumor virus” (WTV) (Nuss y Peterson, 1980) y *Agallia vorobjei* es el vector del “mottled dwarf” de la berenjena (Babaie y Izadpanah, 2003).

La diversidad de insectos vectores de *X. fastidiosa* ha sido estudiado en varios cultivos y regiones donde el patógeno afecta cultivos de importancia. Existen 43 especies de insectos reportados como vectores en su mayoría en cítricos (11) y vid (26) (Redak et al., 2004). Los principales estudios acerca de la eficiencia de transmisión de los insectos a las plantas de cítricos han reportado las especies: *Acrogonia* sp. (2.3%), *Dilobopterus costalimai* (5.5%), *Oncometopia facialis* (1.3%), *Bucephaloginia xanthopis* (11.6%) (Lopes, 1999; Krüchner et al., 2000 citado por Pedreira, 2003). En la vid, la eficiencia es mayor y se han reportado las especies: *Graphocephala atropunctata* (24 - 40%) (Hill y Purcell, 1995b), con menor eficiencia: *Homalodisca coagulata* (10.3 – 19.6%) (Almeida y Purcell, 2003),

La única especie de saltahoja que ha sido reportada en Brasil como vector de la raza de *X. fastidiosa* que afecta al café es *Dilobopterus costalimai* (Ceú et al., 2006; Li et al., 2001). Sin embargo, el rango de vectores en café es desconocido, en estudios realizados en Brasil y Costa Rica, países donde se han reportado ataques severos de la bacteria, se ha encontrado una diversidad de cicadélidos como vectores potenciales pero

se desconoce su eficiencia en la adquisición y transmisión de la bacteria. Dentro de las especies se encuentran para Costa Rica: *Clastoptera* sp., *Empoasca* sp., *Fusigonalia lativittata*, *Graphocephala permagna*, *Neocoelidia* sp. y *Scaphytopius latidens* (Rojas et al., 2001). *Dilobopterus hyalinatulus*, *Dilobopterus instratus*, *Erythrogonia sonora*, *Fusigonalia lativittata*, *Graphocephala bivittata*, *Graphocephala permagana*, *Hortensia similis* y *Macugonalia testudinaria* (Godoy et al., 2005).

En Brasil, se ha reportado como vectores de la bacteria para café nueve especies: *Acrogonia terminalis*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Ferrariana trivittata*, *Homalodisca ignorata*, *Macugonalia leucomelas*, *Oncometopia fascialis*, *Plesiommata corniculata* y *Sonesimia grossa* (Meneguim et al., 2001). Esta información se basa en el resultado positivo mediante la prueba de ELISA para las especies: *D. instratus*, *F. lativittata*, *G. bivittata* y *G. permagna* (Godoy et al., 2005).

6.2 Índices de biodiversidad

Los mayores índices de diversidad H' registrados para las cuatro fincas fueron de 1.14 y 1.11 para Yauco-Sierra Alta y Yauco-Villa Cecilia, respectivamente; estos valores de diversidad son bajos comparados con los obtenidos por Rojas et al. (2001), para un agroecosistema cafetero en sombra para Costa Rica donde dichos valores oscilaron entre 2.56 – 2.84. Así mismo al compararlos con los observados por Pedreira, (2003), para cítricos del litoral norte de la bahía de Brasil tales valores fueron del 1.69 – 2.31 e igualmente a lo obtenido por Ott y Carvalho, (2001) en la vegetación rastrera presente del sur de Brasil, allí la diversidad osciló entre 1.10-2.44. En cuanto a la equidad (J') se

obtuvo valores de 0.75 y 0.77 para estas dos misma fincas, los cuales son similares a lo reportado por Pedreida, (2003) 0.74 y 0.76, pero a su vez son mayores si se comparan con los obtenidos por Rojas et al., (2001). Los bajos valores de diversidad se pueden explicar de igual manera al observar los datos del catastro sobre diversidad de cicadélidos neotropicales realizado por Freitag y Galani, (2002), debido a que como ya se mencionó esta familia fue la más representativa del muestreo.

Finalmente, para la dominancia (D) se obtuvo valores altos a los registrados por Rojas et al., (2001); donde el mayor índice de dominancia fue de 0.15 comparado 0.84 que se registró en Adjuntas, dado que en esta localidad se observó una marcada abundancia de la especie *C. coffeacola* la cual representó el 90.55% del total de individuos colectados. Las altas poblaciones en esta localidad, parecen ser asociadas a la presencia de árboles de sombra típicos en las plantaciones de café en Puerto Rico, tales como: *Inga Vera* (Guaba) (Arango, 2007). El cual sirve como un hospedero para el desarrollo de los estados inmaduros, ya que se encontró a ésta especie de insecto en la mayoría de sus estadios alimentándose de ésta especie de planta, éstas mismas observaciones han sido reportadas por Brodbeck et al. (2006). Así mismo Magurran, 1988. En: Moreno, 2001, reporta que la diversidad puede tomar valores cercanos a 0 cuando hay una especie dominante y a su vez la dominancia altos valores.

6.3 Diversidad bacteriana presente en tres especies de insectos vectores.

La comunidad bacteriana que se aisló de los tejidos (cabeza y cuerpo) de las tres especies de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa*, incluyó 19 géneros bacterianos.

El análisis de conglomerados arrojó 7 asociaciones con características compartidas, lo cual permitió subdividirlos en cuatro grupos de acuerdo al tipo de tejido y tratamiento (desinfestado y sin desinfestar). Dichos grupos se denominaron así: bacterias presentes en la cabeza : aquellas que sólo se presentaron en este tejido, bacterias internas: presentes únicamente en los tejidos desinfestados, bacterias externas: aquellas que sólo se presentaron en los tejidos sin desinfestar, bacterias presentes en todos los ambientes: aquellas que estuvieron presentes en todos los tejidos y tratamientos. De acuerdo a dicha distribución tenemos que se aisló un mayor número de géneros bacterianos a nivel externo (9), seguido de aquellas presente a nivel interno (6), 3 géneros fueron propios de la cabeza y 2 se presentaron en todos los tejidos.

Los géneros *Curtobacterium*, *Micrococcus* y *Pasteurella*, se identificaron como los tres géneros de bacterias presentes en la cabeza de los insectos, por lo que se puede considerar a estas como organismos presentes en el aparato bucal e intestino anterior de estos, a su vez estos géneros son los únicos que podrían asociarse con *X. fastidiosa*, debido a que según Purcell y Hopkins, (1996); Branskly et al., (1991) citados por: Blake et al., (2004); Almeida y Purcell, (2003); es en estas partes de los insectos donde la bacteria reside. Vega et al., (2005) reportó a los géneros *Curtobacterium* y *Micrococcus*, como bacterias endófitas en plantas de café; Santos et al., (2004), encontraron una misma similitud, ellos reportaron al género *Curtobacterium* como común en plantas de cítricos y en la cabeza de los insectos vectores de *X. fastidiosa*: *Oncometopia faciales*, *Dilobopterus costalimai* y *Acrogonia* sp.. El hecho de encontrarlas en la cabeza de los insectos y a su vez presentes en los tejidos internos de las plantas; puede indicar que

dichas bacterias se pueden encontrar en los tejidos vegetales y los insectos las adquieren al alimentarse y ser transmitidas de una planta a otra.

A su vez Araújo et al., (2002); Lacava et al., (2004) encontraron presente a la especie *Curtobacterium flaccumfaciens*, en mayor cantidad en los tejidos internos de plantas de cítricos que no presentaban síntomas aparentes de *X. fastidiosa*, de acuerdo a sus observaciones ellos concluyeron que a nivel *in vitro* esta especie inhibe el desarrollo de *Xylella*. Esta especie ha sido descrita como agente de control biológico de muchos patógenos y ha sido reportada actuando activamente para inducir resistencia sistémica y antibiosis (Raupach, G. y J. Kloepper, 1998; Sturz, A., B. Christie y G. Matheson, 1998. En: Araújo et al, 2002). Dicha especie también se aisló de tejidos de plantas de café y se cree que juega el mismo rol con *Xylella* en estas plantas (Chacon et al., 2006). Por otro lado, cinco de las seis especies conocidas de *Curtobacterium* han sido aisladas de plantas, algunas de ellas reportadas como patógenos (Balows et al, 1992) y otras como organismos endófitos en diversos cultivos, tales como: cítricos (Araújo et al., 2002; Lacava et al., 2004), trébol blanco (Brush y Sarathchandra, 2006), sorgo y maíz (Zinniel et al., 2002), papa (Krechel et al., 2002).

En el género *Micrococcus*, se ha reportado a la especie *M. luteus* en aislamientos de larvas de varias especies de insectos tales como: lepidópteros (Yaman et al, 2002), coleópteros (Yaman et al, 1999; En: Yaman et al, 2002; Sezen et al., 2005); y dípteros (Tóth et al., 2006), a su vez en estas investigaciones se ha evaluado el papel como controlador biológico sobre los adultos en dichas especies de insectos. Si se considera

que la bacteria está presente en las plantas podría inferirse acerca de ésta como un posible agente de control de los insectos vectores.

Dentro del grupo de bacterias internas, se identificaron a los géneros *Brevundimonas*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Rhizobium* y *Vibrio*; bacterias del género *Brevundimonas* han sido aisladas de tejidos internos de pupas del parásito obligado *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae) (Tóth et al., 2006). Jaffe et al., 2001 reportaron éste género en el intestino de la hormiga *Cephalotes pusilus*, ellos sugieren que los microorganismos presentes en este insecto le proveen nutrientes, para que éstas puedan sintetizar aminoácidos a partir de carbohidratos y nitratos. Es importante, destacar que ellos observaron los hábitos alimenticios de la hormiga y encontraron que las secreciones de homópteros forman parte de su dieta; dicha observación podría complementar el hecho de que en éste estudio el género *Brevundimonas* se encontró internamente dentro de los insectos y considerarse en primera instancia como parte de la flora bacteriana interna de dichos insectos.

Especies de *Paenibacillus* son patógenos de insectos, tales como: himenópteros (abejas) (Bíliková et al., 2001; Evans, 2004), coleópteros (Smitley y Rothwell, 2003); asimismo, se ha probado que estas se encuentran asociadas a los estados juveniles infectivos del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* (Enright y Griffin, 2004). Por otro lado, otras especies de este género son consideradas como organismos bioantagonistas (González et al., 2004). Esta especie se aisló del cuerpo desinfestado de insectos de la especie *H. similis*, no se podría hacer inferencia acerca del papel de este género bacteriano en los insectos.

Bell et al., (2005), aislaron bacterias del género *Pantoea* a partir del intestino anterior y partes externas del chinche apestoso. Ellos concluyen que los daños atribuidos a este tipo de insectos en los cultivos, se debe principalmente a que éstos son portadores de bacterias patógenas. De igual manera Wells et al., (2002); Gitaitis et al., (2003), aislaron a la especie *Pantoea ananatis* de tejidos internos (superficies esterilizadas) del trípido del tabaco (*Frankliniella fusca*), los datos obtenidos por ellos apoyan la teoría de que existe una relación fuerte entre la alimentación de los trípidos y la presencia de esta especie bacteriana en la superficie de las hojas. Para este estudio dichas observaciones se consideran relevantes dado el hecho de que la especie *Pantoea ananatis* (72.9% similitud) (Anexo 8), se aisló de la cabeza desinfestada de *H. similis*, lo que indica que es una bacteria presente en el aparato bucal e intestino anterior de dicho insecto, por lo que podría considerarse de forma preliminar a ésta especie de insecto como vector potencial de este patógeno.

Especies del género *Providencia* han sido aisladas de diferentes especies de insectos, tales como lepidópteros (Spiteller et al., 2000); dípteros (Kuzina et al., 2004; Tóth et al., 2006), así como de especies de nemátodos fitopatógenos (Jackson et al., 1995). Kadavy et al., (1999) sugieren que bacterias del género *Providencia* aisladas de nemátodos mayormente de *Heterorhabditis* pueden ser patógenas de insectos. Por otra parte, Kuzina et al., (2004) aislaron bacterias de este mismo género en adultos de insectos de mosca de la fruta, ellos sugieren que estas especies podrían ser usadas como organismos de control biológico.

Especies del género *Vibrio* son de importancia clínica, ya que estos son agentes causales de enfermedades en humanos y animales, de igual manera, se encuentran ampliamente distribuidos, aunque la mayoría de reportes data de estos en ambientes marinos y como agentes causales de enfermedades intestinales en humanos (Blake et al., 1979; Coldwell, 1984 citados por Ballows et al., 1992).

Dentro del grupo bacterias externas tenemos los géneros: *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Kluyvera*, *Kokuria*, *Nocardia*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas*. El género *Acitenobacter*, corresponde a organismos con amplia distribución pueden presentarse de forma primaria en el suelo y agua (Baumann, 1968 citado por Balows et al., 1992). Evans y Armstrong, (2005), reportan al género *Acitenobacter* como una bacteria simbiote presente en larvas de la abeja melífera, a su vez ellos, le adjudican un posible papel antagónico en el control de la especie *Paenibacillus larvae*, considerado patógeno primario de esta especie de insectos. De igual manera, este género ha sido aislado del intestino de larvas de la oruga del algodón *Helicoverpa armigera* (Hui et al., 2006). Bahar y Demirbag, (2007); aislaron éste género como presente a nivel interno de larvas de *Ozerea linearis* (Coleoptera:Cerambycidae), a su vez ellos probaron la patogenicidad de este para el control de larvas del mismo insecto. En este caso se aisló de la cabeza sin desinfestar de *C. coffeacola*, a su vez este género se aisló internamente de plantas de café (Franco et al., 2006). Dado estas observaciones, podría adjudicarse a esta bacteria un papel de biocontrolador de plagas dentro de los cafetales.

El género *Chryseobacterium* ha sido identificado en insectos de importancia clínica, como es el caso de *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae), básicamente se aisló del intestino de hembras de dicha especie (Cambell et al., 2004). Dado que se observó en el cuerpo sin desinfestar de *Apogonalia*, en este caso no se puede hacer una clara referencia acerca de su localización en dicho insecto, a nivel interno o externo.

La mayoría de las especies de bacterias del género *Clavibacter* han sido reportadas como patógenas de plantas (Balows et al., 1992). Mayormente, las enfermedades asociadas con marchitez vascular, que son ocasionadas por especies de este género, en la cual la bacteria invade el xilema son asociadas íntimamente con insectos vectores (Mitchell, 2004). Específicamente para la especie *C. michiganensis* subs. *sepedonicus*, agente causal de la pudrición del anillo de la papa, dentro de sus posibles insectos vectores se han reportado: el escarabajo colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) y el áfido verde del melocotón (*Myzus persicae*) (Christie et al., 1991. Citados por Van der Wolf et al., 2005). Sin embargo, la transferencia de ésta por los insectos tiene baja incidencia (Van der Wolf et al., 2005). En este estudio se aisló de la cabeza sin desinfestar de *Hortensia similis*, lo que indica su posible presencia en el aparato bucal en intestino anterior, a su vez esta ha sido encontrada en los tejidos internos de plantas de café (Vega et al., 2005; Franco et al., 2006), se podría pensar en esta especie de insecto como vector primario de dicho género bacteriano a las plantas de café.

El género *Kluyvera* se ha reportado como habitante común de suelo, agua y en algunos casos de importancia clínica (Krieg y Holt, 1984). En insectos, algunas especies

han sido aisladas del intestino y partes externas de insectos conocidos como chinche apestosa (Bell et al., 2005). Este género se aisló del estómago de la mosca oriental de las frutas *Dacus dorsalis* (Diptera:Tephritidae) (Jang y Nishijima, 1990). En este caso se aisló del cuerpo sin desinfectar de *Apogonalia*, no se tiene ningún reporte de este en plantas de café.

Franco et al., (2006) aislaron la especie *Kocuria cristinae* de tejidos internos de plantas de café, a su vez, esta mostró tener un papel antagónico en el control de *Hemileia vastratix*, ya que controló un 40% de las uredosporas probadas. Para este estudio se identificó en el cuerpo sin desinfectar de *H. similis*, lo que no permite identificar su origen y su posible papel dentro de este estudio.

El género *Nocardia* se encuentra ampliamente distribuido, es muy común en el suelo, también puede formar relaciones mutualistas con insectos chupadores (Cross et al., 1976 citados por Balows et al., 1992). Sólo una especie ha sido reportada como patógeno de plantas *Nocardia vaccinii* agente causal de agallas (Demaree y Smith, 1952 citados por Balows et al., 1992). Araújo et al, (2002) y Lacava et al., (2004), aislaron a este género de los tejidos internos de plantas de cítricos. En ésta investigación se obtuvo del cuerpo sin desinfectar de *H. similis*, dado dicha localización no se puede hacer una inferencia acerca de la relación planta-insecto, respecto a este género bacteriano.

Bacterias del género *Pectobacterium* han sido reportadas como organismos epífitos, los cuales según: Lacy y Lukezic, (2003), se nutren en la superficie de las plantas. De igual manera, muchos organismos patógenos de plantas, pueden coexistir como epífitos en su hospedero sin causar enfermedad, siendo su etapa de sobrevivencia y

patogenicidad cuando crecen dentro como organismos endofíticos. De acuerdo, con dichas observaciones, se podría inferir que éste género se presentó en los insectos dado que se encontraba en la superficie y éstos la adquieren al entrar en contacto con las plantas y/o al alimentarse. Debido a que éste se aisló de la cabeza sin desinfestar, lo que no permite diferenciar, acerca de si está interna o externamente en los tejidos de *H. similis*, en este caso.

Las bacterias del género *Pseudomonas*, normalmente se encuentran en el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales (*P. aeruginosa*) y patógenos de plantas (*P. syringae*). (Schaad et al., 2001; Schaad et al., 2001). Para plantas de café en Puerto Rico han sido reportadas causando enfermedades en este cultivo, las especies *P. cichorii* (Sánchez et al., 2003), *P. syringae* (Cortés, 1988). Agrios, (1997) citado por Mitchell, (2004), reporta que las bacterias de este género pueden ser propagadas a través de la alimentación de insectos. Con base en ello, Mitchell, (2004), observó que el chincheapestoso *Nezara viridula*, es capaz de transmitir 31 tipos de bacterias, en las que se reporta una especie del género *Pseudomonas* como patógena, al inocularse en hojas de soya, ocasionando manchas en las hojas y necrosis en las venas. Por otro lado, Martin et al., (1987), aislaron bacterias del género *Xanthomonas* y *Pseudomonas* de las glándulas salivares de la pulga saltona del algodón *Pseudatomoscelis seriatus*. Dado los anteriores reportes, podría adjudicarsele en primera instancia al aislamiento obtenido para éste estudio, un papel patogénico dentro de los cafetales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta de igual manera organismos de éste mismo género han sido aisladas como endófito en diferentes cultivos: café (Vega et al., 2005), papa (Sturz et al., 1998; Kretchel et al.,

2002), soya (Kuklinsky, 2003), cítricos (Gardner et al., 1985 citados por Lacava et al, 2004), arroz (Barranquio et al., 1983). Donde se le ha adjudicado en algunos casos un alto potencial como biocontroladores (Krechel et al., 2002), promoviendo el crecimiento de las plantas (Frommel et al., 1991); fijando nitrógeno (Weber et al., 2001).

Finalmente los géneros *Bacillus* y *Microbacterium* se denominaron como presentes en todos los ambientes, dado que éstos se aislaron de todos los tejidos y tratamientos. Se observó al género *Bacillus* como el género bacteriano predominante en la especie *Apogonalia*, este estuvo presente a nivel de cuerpo y cabeza, interna y externamente, una primera explicación puede ser dada en base a la presencia de sus endosporas, lo que les ayuda a colonizar fácilmente cualquier ambiente (Schaad et al., 2001). Dicha distribución concuerda con lo observado por Tóth et al., (2006), quienes reportan a *Bacillus* como dominante cuando se aisló de larvas de la mosca *Wohlfahrtia magnifica*, ya que al igual que este estudio, este se encontró en todos los tejidos (intestino anterior, intestino medio, intestino posterior, cutícula).

El género *Microbacterium*, no se encontró en la cabeza desinfectada por lo que se considera no presente en parte del intestino anterior y aparato bucal. Por lo tanto, este género en primera instancia podría considerarse que no tiene ninguna relación con *Xylella*. Caesar y Kremer, (2004), aislaron bacterias asociadas al pulgón dorado *Aphthona* sp., ellos reportaron una posible interacción sinergista entre dicho insecto y varios géneros bacterianos en los que se encuentra *Microbacterium*, para el control de plantas plaga tal como *Euphorbia esula*, debido a que éste tipo de plantas posee sustancias venenosas. Por otro lado, Bahar y Demirbag, (2007) aislaron dos especies de bacterias del

género *Microbacterium* a partir de tejidos internos de larvas de *Ozerea linearis*, que mostraban síntomas de enfermedad y larvas muertas, ellos probaron su posible papel como controlador biológico de dicha plaga. Dado que en este estudio se aisló de todos los tejidos de los insectos, no se puede hacer una clara inferencia acerca de su procedencia y relación con las plantas e insectos.

6.4 Determinación de la presencia de *X. fastidiosa* mediante la prueba de ELISA.

Se registró un resultado positivo en la detección de *Xylella*, mediante la prueba de ELISA para algunos aislamientos Gram negativos en forma de bacilos, obtenidos a partir de los diferentes tejidos dos especies de insectos. En el primer ensayo se observó una reacción positiva para un total de cuatro aislamientos, uno proveniente del cuerpo desinfestado de *Hortensia similis* y tres de los tratamientos sin desinfestar de *Caribovia coffeacola*. Pero, los otros dos intentos para confirmar la reacción resultaron negativos. Estos aislados se identificaron en los géneros *Microbacterium* y *Providencia*, respectivamente mediante el análisis de ácidos grasos CG-FAME. Dichos resultados sugieren que en el primer ensayo se pudo detectar a *X. fastidiosa* y luego posiblemente al subcultivarla para reactivarla antes de realizar ensayos posteriores, se perdió o se redujó su población, debido a su crecimiento lento y la competencia por el mismo nicho con los géneros *Microbacterium* y *Providencia* que son de organismos de crecimiento rápido. Lo que favoreció la proliferación de éstos últimos. Dicha inferencia se basa en que la prueba de ELISA a pesar de ser altamente sensitiva, requiere altas poblaciones bacterianas para su detección de 10^5 y 10^6 UFC/mL (Nomé et al., 1980; Wang et al., 1999).

6.5 Diversidad bacteriana presente en los tejidos internos de café.

Todos los géneros bacterianos aislados de las plantas en este estudio son considerados como endofíticos, ya que este tipo de organismo puede ser aislado de superficies desinfectadas de las plantas o por extracción de sus tejidos internos (Hallmann et al., 1997; Zinniel et al., 2002; Araújo et al., 2001; Araújo et al., 2002). En general, los organismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular. Dicha localización presenta un nicho ecológico similar al ocupado por algunos organismos patógenos de plantas (Franco et al., 2006). Por tanto, son candidatos fuertes para ser usados como organismos de biocontrol de patógenos, insectos, nematodos (Azevedo et al., 2000; Zinniel et al., 2002). La protección podría ser a través de efectos antagónicos, debido a la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos o por el desencadenamiento de una respuesta de defensa de la planta en contra de éstos inducida por el organismo endófito (Muñoz y Caballero, 2007). Asimismo, se ha demostrado que estos pueden acelerar la emergencia de las plántulas y promover su establecimiento a pesar de condiciones adversas; mejorar el crecimiento de las plantas (Sturz et al, 1998). De acuerdo con Tilak et al., (2005) este crecimiento puede ser promovido en las plantas de forma directa, mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de minerales tales como el fósforo, producción de sideróforos que solubilizan y secuestran el hierro o producción de reguladores (hormonas) de crecimiento y/o de igual manera indirectamente al producir sustancias antagónicas que como ya se mencionó inducen resistencia a patógenos. Sin embargo, Musson, (1994)

citado por Franco et al. (2006) considera que algunos organismos endófitos pueden no ser patógenos en su huésped, pero si en otros.

Para este estudio se aislaron nueve géneros bacterianos, a partir de tejido foliar desinfectado de plantas café *C. arabica*; Lacava et al. (2004) consideran que las hojas son el nicho preferencial para las bacterias endofíticas. De igual manera, se determinaron a *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*, como los géneros predominantes en cuanto a su frecuencia de aislamiento. De acuerdo, con Schaad et al. (2001) la mayoría de los bacilos asociados con plantas son reconocidos como patógenos, saprófitos y agentes de control biológico. Reva et al., (2002); reportan a las bacterias del género *Bacillus* como residentes comunes de los tejidos internos de las plantas, algunos de estos organismos juegan un papel importante en la protección y crecimiento de las plantas. Kloeper et al., (2004), adjudican a este género bacteriano capaces de inducir resistencia sistémica en las plantas la cual provee protección contra enfermedades por hongos, bacterias, nematodos, virus y reducción en la presencia de insectos vectores.

El género *Micrococcus* ha sido aislado de igual manera, de los tejidos internos de plantas de café (Vega et al., 2005; Franco et al., 2006), en cítricos (Araújo et al., 2002), en papa (Krechel et al., 2002), sorgo y maíz (Zinniel et al., 2002), organismos de éste género son considerados activos para solubilizar fósforo insoluble (Tilak et al., 2005). En esta investigación se aisló tanto de los tejidos desinfectados de las plantas como de los tejidos de los insectos.

El género *Staphylococcus* ha sido reportado mayormente como parte de la flora natural de la piel de la mayoría de las especies de mamíferos (Moler, 2001), de igual

manera es conocido como agente patógeno de humanos y animales (Nodarse, 2001); a su vez éste género es reportado como capaz de producir sustancias extracelulares bacteriolíticas, sumado a la producción de autolisinas (endolisinas) (Schindler y Schuhardt, 1964). El aislamiento de este género como organismos endófito de las plantas de café concuerda con lo observado por Zapata, (2007), allí se reportan cuatro especies de este género como bacterias endófitas frecuentes asociadas al tejido vascular de café y a su vez, tres de éstas se registraron como comunes en cultivos de cítricos

Asimismo, se lograron identificar dentro de los aislamientos de las plantas de café, aunque en una menor frecuencia de aislamiento a los géneros: *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium* y *Sphingobacterium*.

El principal hábitaculo de organismos del género *Arthrobacter* es el suelo (De la Rosa y Mosso, 2007), asimismo, Tilak et al., (2005) informan a este género asociado a la rizosfera de las plantas y creciendo de forma endófito dentro de éstas. Ellos reportan a estos organismos como microorganismos que solubilizan fosfato, Gaur et al., (2004) consideran que estas bacterias pueden añadir 30-35 kg de P_2O_5 por hectárea. Con relación a lo observado en esta investigación, organismos de éste género han sido aislados de igual manera de los tejidos del xilema de plantas de limón *Citrus jambhiri* (Araújo et al., 2001) El género *Chryseobacterium*, ha sido igualmente aislado de tejidos internos de trébol blanco (*Trifolium repens*) (Brush y Sarathchandra, 2006).

Al igual que en este estudio, el género *Clavibacter*, también se identificó como un organismo endófito para plantas de café (Vega et al., 2005), papa (Sessitsch et al., 2004), en esta última investigación los aislamientos identificados dentro de éste, mostraron tener

actividad antibacteriana y antifungal, contra patógenos tales como: *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*. Sin embargo, la mayoría de reportes identifican a las especies conocidas de *Clavibacter* como patógenos de plantas. Se han encontrado que estas muestran especificidad con sus hospederos (Bradbury, 1986 citado por Balows et al, 1992). Vivader, (1982) citado por Zunniel et al, (2002) reportan a este género causando enfermedades tales como: marchitez bacterial de la alfalfa y el maíz, cancro bacterial del tomate y el pimiento, aunque de forma natural también ocurren ciertas especies no patógenas.

El género *Enterobacter* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (De La Rosa y Mosso, 2007), al igual que en esta investigación bacterias de éste género han sido aisladas de tejidos internos de plantas sanas de cítricos, a su vez ha sido determinado, como uno de los géneros de mayor frecuencia de aislamiento (Araújo et al., 2001), también ha sido aislado de tejidos de plantas de maíz y algodón (McInroy y Kloepper, 1995). Tilak et al., (2005) reportan a miembros de este género como candidatos viables para ejercer efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas.

Ballows et al., (1992), reportan como principales habitáculos del género *Rhizobium* al suelo y los tejidos vegetales, con diversas funciones tales como: fijación de nitrógeno atmosférico (Acosta y Martínez, 2002; Zurdo et al., 2004), producción de hormonas de crecimiento idénticas a las sintetizadas por las plantas entre las que se encuentra el ácido indolacético (AIA) (Costacurta y Vanderleyden, 1995 citados por Maciel, 2005), solubilización de fósforo inorgánico (Rodríguez y Fraga, 1999).

Al igual que en ésta investigación el género *Sphingobacterium* ha sido aislado de tejidos internos de plantas de maíz, se le adjudica un papel importante en la solubilización de fósforo inorgánico (Maciel, 2005). En papa, en el cual se evaluó su potencial antagonico sobre hongos y nematodos fitopatógenos que afectan este cultivo (Krechel et al., 2000).

6.6 Comparación de la diversidad bacteriana observada en los tejidos de insectos y los tejidos internos de café.

Sólo se encontraron cinco géneros comunes en los tejidos de los insectos y las plantas, dichos géneros fueron: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Micrococcus* y *Rhizobium*. El primer género *Bacillus* se aisló de todos los tejidos y tratamientos de los insectos, a su vez éste se determinó como uno de los más dominantes dentro de los tejidos internos de las plantas dada su frecuencia de aislamiento, esto se puede explicar en base a la presencia de sus endosporas, lo que les ayuda a colonizar fácilmente cualquier ambiente (Schaad et al., 2001). El género *Micrococcus* se determinó como el único presente solamente en la cabeza desinfestada de los insectos, a su vez el hecho de encontrarla igualmente dentro de las plantas, permite inferir de forma preliminar que éste género esta relacionado directamente con la alimentación de los insectos, bien sea porque éstos la adquieren al alimentarse de las plantas o son los insectos quienes los transmiten con la alimentación. Por otro lado, los géneros *Clavibacter* y *Chryseobacterium* se aislaron de los tejidos externos de los insectos, lo que no permite precisar la localización exacta de éstos en los insectos y la relación al identificarlos como endófitos en las plantas.

6.7 Consideraciones relacionadas a los métodos empleados para la detección de *X. fastidiosa*.

Se encontraron especies de insectos que poseen características para considerarlos vectores potenciales de *X. fastidiosa* para los cafetales en Puerto Rico. En dos especies de éstos se logró detectar a *X. fastidiosa* mediante la prueba de ELISA, pero no se logró confirmar la presencia de ésta mediante aislamiento. Probablemente una de las dificultades se asocia directamente a las limitaciones de los métodos utilizados para su detección y confirmación. La Prueba de ELISA aunque es bastante sensitiva, está basada en anticuerpos policlonales que le permiten unirse a múltiples proteínas, por lo que en algunas ocasiones puede a su vez dar falsos positivos. De igual manera, requiere altas poblaciones bacterianas de $10^5 - 10^6$ UFC/mL para su detección (Nomé et al., 1980; Wang et al., 1999). Por último, un resultado positivo definitivo, debe ser aquel cuya absorbancia supere dos veces la del control negativo (Costa et al., 2004). Finalmente, un resultado positivo debe ser consistente y confirmado en varias repeticiones.

El aislamiento de *X. fastidiosa* en medio de cultivo, se utilizó como método de confirmación. Esto es por la limitación que se ha reportado en otros estudios para detectar la presencia de ésta directamente de los insectos, mediante la prueba de ELISA. Dada las bajas poblaciones bacterianas presentes en éstos, así como la formación de agregados celulares (Raju et al., 1983; Mundell, 2005) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a que se ha demostrado que algunas sustancias presentes en los tejidos de los insectos inhiben las reacciones de PCR (Pooler et al., 1997; Blake et al., 2004). A pesar de seguir la metodología de aislamiento utilizada por Hill y Purcell, (1995a) y

Mundell, (2005), no se logró aislar la bacteria *X. fastidiosa*. Posiblemente por su crecimiento lento, presencia de inhibidores y la competencia con otras bacterias presentes de crecimiento rápido (Almeida y Purcell, 1996). Uno de los aciertos usando este método fue el aislamiento de otros organismos endófitos que en otras investigaciones han sido reportados como relacionados directamente con *X. fastidiosa*, como en el caso de *Curtobacterium flaccumfaciens*, la cual antagoniza con el desarrollo de ésta.

En general, la mayor dificultad para el aislamiento de *X. fastidiosa* de tejidos de insectos y plantas, podría asociarse a la ocurrencia de la bacteria en agregados y a la localización en el aparato bucal y parte del intestino anterior de los insectos, unido a la baja concentración en los tejidos de las plantas; esto sugiere ocasionalmente la pérdida de la bacteria desde los insectos (Hill y Purcell, 1995a).

7. CONCLUSIONES

1. La familia Cicadellidae se reconoció como la más representativa en cuanto al número de especies e individuos presentes en las plantaciones de café. Sin embargo, la riqueza de especies de esta familia para Puerto Rico es baja comparada con otros países del neotrópico.
2. Los vectores potenciales de *X. fastidiosa* reportados en este estudio, se ubicaron únicamente dentro de la familia Cicadellidae. Esto es *Caribovia coffeacola*, dominante para las fincas de Adjuntas, Juana Díaz y Yauco-Villa Cecilia; *Apogonalia* spp. dominante en Yauco-Sierra Alta y *Hortensia similis*, la cual se identificó mayormente asociada a la vegetación rastrera presente.
3. Las especies *Agallopsis pepino* y *Agallia pulchra*, se determinaron como dominantes para las dos fincas ubicadas en Yauco.
4. Los géneros *Pasteurella*, *Micrococcus* y *Curtobacterium*, se identificaron como las únicas bacterias propias del aparato bucal y parte del intestino anterior de los insectos, son las únicas que podrían interaccionar con *X. fastidiosa*.
5. La mayoría de los géneros bacterianos aislados de los tejidos de los insectos han sido reportados como organismos importantes de control biológico; excepto por *Clavibacter*, *Pantoea*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas*, que contiene algunas especies patógenos importantes en la agricultura.
6. Los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*, se identificaron como predominantes en los tejidos de las plantas de café.

7. Los géneros *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Micrococcus* y *Rhizobium*, se reconocieron como comunes en los tejidos de los insectos y las plantas.
8. Se logró detectar la presencia de *X. fastidiosa* mediante la prueba de ELISA para cuatro aislamientos bacterianos provenientes de los tejidos de las especies de insectos *C. coffeacola* y *H. similis*. Sin embargo, no se logró confirmar la presencia de ésta mediante aislamiento en medio de cultivo.

8. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la utilización de la prueba de ELISA para detectar la presencia de *X. fastidiosa* directamente a individuos de las tres especies de insectos reportados como vectores potenciales: *Caribovia coffeacola*, *Hortensia similis* y *Apogonalia* spp, incluir las especies *Agalliopsis pepino* y *Agallia pulchra* y confirmar mediante PCR.
2. Utilizar metodologías descritas para superar los problemas en la detección de *X. fastidiosa* tales como: la técnica de separación inmunomagnética para concentrar la bacteria, de forma tal que se puedan detectar bajos niveles de ésta usando PCR.
3. Auscultar procedimientos alternos que ayuden a concentrar e incrementar las población bacteriana en los diferentes tejidos antes de realizar su aislamiento en medio de cultivo.
4. Establecer experimentos de preferencia con las especies *Apogonalia* spp. y *Agallia pulchra* para determinar si éstos se alimentan de las plantas de café, a fin de corroborarlo como vectores potenciales.
5. Se recomienda probar la eficiencia en la adquisición y transmisión por parte de los insectos, para la especie bacteriana *Curtobacterium flaccumfaciens*, a fin de determinar la posible transmisión de ésta por los insectos a las plantas.
6. Evaluar la patogenicidad en plantas de café de los géneros: *Pantoea*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas* y establecer si estas especies de insectos son vectores de estas bacterias.

7. Probar el potencial biocontrolador de: *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus* y *Providencia* para el control de insectos.
8. Establecer la interacción de: *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* aislados de los tejidos vegetales con *X. fastidiosa*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, C. y E. Martínez. 2002. Diversity of rhizobia from nodulates of the leguminous trees *Gliricidia sepium*, a natural host of *rhizobium tropici*. *Arch. Microbiol.* 178:161-164.
- Almeida, R.P. y A.H. Purcell, 2003a. *Homalodisca coagulata* (Hemiptera:Cicadellidae) transmission of *Xylella fastidiosa* to almonds. *Plant Dis.* 87: 1255-1259
- Almeida, R.P. y A.H. Purcell, 2003b. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *J. of Econ. Entomol.* 96 (2): 264-271.
- Anthony, F., C. Astorga, O. Quiros, B. Bertrand, H. Etienne, P. Topart y P. Lashermes. 2003. Diversidad genética de los cafés (*Coffea arabica*) silvestres y cultivados, revelada por marcadores moleculares. *PROMECAFE*. Boletín Numero 9: 8-12.
- Anzueto, F., T. W. Baumann, G. Graziosi, C.R. Piccin, M.R. Söndahl y H.A. Vossen. 2005. Coffee The Science of Quality. Elsevier Academic Press 2da. Ed. California, U.S.A. 21-86 pp.
- Arango, M. 2007. Zonificación agroecológica del café en Puerto Rico y análisis estructural y de composición de especies arboréas presentes en el agroecosistema cafetero. Tesis M.S. Departamento de Agronomía y Suelos. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 126 pp.
- Araújo, W., W. Maccheroni, C. Aguilar, P. Barroso, H. Saridakis y J. Azevedo. 2001. Variability and Interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47: 229-236.
- Araújo, W., J. Marcon, W. Maccheroni, J. Elvas, J. Vourde y J. Azevedo. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10): 4906-4914.
- Azevedo, J., W. Maccheroni, J. Pereira y W. Araújo. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>>.
- Babaie, G. y K. Izadpanah. 2003. Vector eggplant mottled dwarf virus in iran. *J. Phytopathology* 151: 679-682.
- Bahar, A. y Z. Demirgab. 2007. Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea linearis* (Coleoptera:Cerambycidae). *Biologia* 62(1): 13-18.

- Balows, A.; H. Tryper, M. Dworkin, W. Harder y K. Schleifer. 1992. The Prokaryotes. Second edition. Volumen I-IV. 1192-1196 pp.
- Barraquio, W., J. Ladha y I. Watanabe. 1983. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 29:869-873.
- Bell, A., J. Lopez, J. Esquivel, E. Medrano y J. Mauney. 2005. Isolation of cottonseed-rooting *Pantoea* spp. from stink bugs and plants bugs. Memories of *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences* January 4-7 http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=176993>.
- Beltrán, V. S. Cacerés y H. Zubrzycki. 2004. CVC associated vectors in valencia orange of corrientes Argentina. Memorias del Congreso Proc. Int. Soc. Citriculture. <<http://www.inta.gov.ar/bellavista/info/documentos/citricos/P75-zubrzcki-eltran.ult.pdf>>
- Berisha, B., Y. Chen, G. Zhang, B. Xu y T. Chen. 1998. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 427-433.
- Bíliková, K., G. Wu y J. Šimúth. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antiforulbrood factor. *Apidologie* 32: 275-283.
- Blake, B., T. Shu-Jen, H. Shaikh, M. Blua y T.A. Millar, 2004. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the Glassy-Winged Sharshooter. *J. of Econ. Entomol.* 97 (3): 757-763.
- Blua, M. y D.J. Morgan, 2003. Dispersion of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae), a vector of *Xylella fastidiosa*, into vineyards in southern California. *J. Entomol. Soc. of Amer.* 96 (5): 1369-1374.
- Blua, M., R. Redak, D. Morgan y H. Costa, 2001. Seasonal flight activity of two especies (Homoptera: Cicadellidae) that spread *Xylella fastidiosa* in Sotuhern California. *J. of Econ. Entomol.* 94 (6): 1506-1510.
- Bradbury, J.F., 1991. Descriptions or pathogenic fungi and bacteria No. 1049. CAB International, Wallingford, UK.
- Brodbeck, B. y P. Andersen. 2006. Status of xylem limited bacterium *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. NFREC NEWS. North Florida Research and Education Center, University of Florida. 8(19): 3 p.
- Brodbeck, P., M. Zapata, S. Oden, Y. Mariño y P. Andersen. 2006. Potential leafhoppers vectors of *Xylella fastidiosa* in Puerto Rico. *Memories of Caribbean Food Crops Society*. San Juan Puerto Rico, July 9 to 15. 74 p.

Burch, G. y U. Sarathchandra. 2006. Activities and survival of endophytic bacteria in white clover (*Trifolium repens* L.). *Can. J. Microbiol.* 52: 848 – 856.

CABI/EPPO, 2005. Data sheets on quarantine pest *Xylella fastidiosa*. http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xylella_fastidiosa/XYLEFA_ds.pdf

Caesar, A. y R. Kremer. 2004. Bacterial communities associated with a flea beetle used for the biological control of the perennial leed *Euphorbia esula virgata*. *Memories of Xi symposium on Biological Control of Weeds*. April 15, 2004. <http://ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=159417>.

Caldwell, J. y L. Martorell, 1952. Review of the auchenorynchous homoptera of Puerto Rico. *J. Agric. Univer. P.R.* 34: 11.

Cambell, C., D. Mummey, E. Schmidtman y W. Wilson. 2004. Culture-indepnedent analysis of midgut microbiota in the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera:Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.* 41(3): 340-348.

Céu, M., V. Várzea, L. Guerra, H. Gil, D. Fernandez, A. Petitot, B. Bertrand, P. Lashermes y N. Nicole. 2006. Coffee resistance to the main disease: lead rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18 (1): 119 -147.

Chacón, C., M. Montero, J. Hartung, W. Li, L. Garita y C. Rivera. 2006. Isolation, description and identification bacteria associated with diseased coffee and avocado from Costa Rica. *Phytopathology* 96(6): S142.

Chang, C. y R. Donaldson. 2000. Nutritional requirements of *Xylella fastidiosa*, which causes Pierce's disease in grapes. *Can. J. Microbiol.* 46: 291-293.

Coldwell, R. 2005. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species form samples. Versión 7.5. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Conneticut, U.S.A. <<http://viceoy.eeb.uconn.edu/estimastes>>.

Coll, O., A. Renes, J. Agostini y S. Paradell. 1998a. Bases para la discusión acerca del Manejo Integrado de Homópteros auquenorrincos potenciales vectores de CVC en citrus. *Citrumisiones* (27): 12-31.

Coll, O., A. Renes, J. Agostini, y S. Paradell. 1998b. Aspectos generales de la clorosis variegada de los citricos (CVC) en misiones. *Citrumisiones* 27: 1-11.

Cortés, M. 1988. Bacterial leaf spot of coffee. *J. Agric. Univer. P.R.* 72 (4): 621-623.

Costa, H., E. Raetz, T. Pinckard, C. Gispert, R. Hernández-Martínez, C. Dumenyo y D. Cooksey. 2004. Plants hosts of *Xylella fastidiosa* in and near south California vineyards. *Plant Dis.* 88: 1255-1261.

DAC (Departamento de Agricultura y Comercio). 1942. Coffee from Puerto Rico. New York Service, New York, USA. 61 pp.

da Silva, F., A. Vettore, E. Kemper. A. Leite y P. Arrunda. 2001. Fastidian gum: The *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiol. Lett* 203 (2): 165-171.

De La Rosa, M. y M.A. Mosso. 2007. Diversidad microbiana de las aguas minerales termales. *Boletín Panorama actual de las aguas minerales y minero-medicinales de España.* 153-158.

Departamento de Agricultura, 2005. Ingreso bruto agrícola de Puerto Rico. 2004/2005. Oficina de Estadísticas Agrícolas. Santurce, Puerto Rico.

Enright, M. y C. Griffin. 2004. Specificity of association between *Paenibacillus* spp. and the entomopathogenic nematodos, *Heterorhabditis* spp. *Microbial Ecology* 48(3): 414-423.

Evans, J. 2004. Transcriptional immune reponses by honey bee larvae during invasión by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85(2): 105-111.

Evans, J. y T. Armstrong. 2005. Selective screening for honey bee bacterial symbionts that inhibit a key bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Apicul. Research* 44: 168 - 171.

Franco, H., H. Alves, I. Soares, F. Nunes y W. Bettiol. 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Sci. agric.* 63(1): 22-29.

Freitag, P. y M. Galani. 2002. Cicadellidae neotropicales, biodiversidad de Cicadellidae por país. <<http://www.miza-fpolar.info.ve/cicadellidae/pais.php?LNG=1>>

Frommel, M., J. Nowak y G. Lazarovits. 1991. Growth enhancement and development modifications of *In Vitro* growth potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96: 928-936.

Garita, J., C. Godoy, W. Villalobos y C. Rivera. 2006. Leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) as potencial vectors of *Xylella fastidiosa* in Costa Rica. *Phytopathology* 96(6): S142.

- Garland, J. 1999. Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. methods of microbial community análisis microbial biosystems: new frontiers proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P(ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Gaur, R., N. Shani, J. Kawaljeet, B. Rossi y M. Aragno. 2004. Diacetyl phloroglucinol-producing *Pseudomonas* do not influence AM fungi in wheat rhizosphere. *Curr. Sci.* 86: 453-457.
- Gitaitis, R., R. Walcott, M. Wells, J. Díaz y F. Sanders. 2003. Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. *Plant Dis.* 87: 675-678.
- Godoy, C., J. Garita, W. Villalobos y C. Rivera. 2005. Diversity of Cicadellidae (Hemiptera:Auchenorrhyncha:Membracoidea) and potencial vectors of *Xylella fastidiosa* in coffee plants. Memories of 12th Internacional Auchenorrhyncha Congress. University of California, Berkeley. August 7-12.
- González, R., J. Montealegre y R. Herrera. 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Cien. Inv. Agr.* 31(1): 21-28.
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. Mahaffee y J. Kloepper. 1997. Endophytic bacteria in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- Hammer, O. 2002. Paleontological community and diversity analysis (PAST)- brief notes. Zürich, June 3.
- Hartung, J., J. Berreta, R. Brlansky, J. Spisso y R. Lee. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84: 591 – 597.
- Hayward, A. 1983. Primary diferenciacion of the genera of plant pathogenic bacteria. Plant Disease A Diagnostic Guide. Edited by P.C. Fahay and G.J. Persley. Academic Press, Sidney, Australia. 13-26 p.
- Hernández, L. y F. Ochoa. 1997. Detección de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* por medio de ELISA-DAS en vid (*Vitis vinifera* L) y malezas en viñedos del Municipio de Mara, estado Zulia Venezuela. *Rev Fac Agron (LUZ)* 14: 297 – 306.
- Hickel, E., J. Ducroquet, R.P. Leite y R.M. Leite. 2001. Fauna de Homoptera: Auchenorrhyncha em pomares de Ameixeira em Santa Catarina. *Neotropical Entomology* 30 (4): 725-729.

- Hill, B. y A. Purcell, 1995a. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85: 209-212.
- Hill, B. y A. Purcell, 1995b. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* 85: 1368-1372.
- Hill, B. y A. Purcell, 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87: 1197-1201.
- Historical Climate Summaries for Puerto Rico and the US. Virgin Islands. 2005. U.S. Department of Commerce-NOAA- southeast regional climate center. <<http://www.dnr.state.sc.us/climate/sercc/climateinfo/historical.pr.html>>. Junio de 2006.
- Hopkins, D. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogens of plants. *Annual Review of phytopathology* 27: 271-290.
- Hopkins, D. 1995. *Xylella*. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edition. <<http://grove.ufl.edu/~jbjones/XylellaLecture%202006.doc>>.
- Hui, X., W. Gui-Fang, J. Shihai, H. Jianhua, M. Xue-Xia, Z. Zhihua, Z. Li-Ping y H. Yong-Ping. 2006. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can. J. Microbiol.* 52(11): 1085-1092.
- Infostat, 2006. *Infostat, version 2006*. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina.
- Jackson, T., H. Wang, M. Nugent, C. Griffin, A. Burnell y B. Dowds. 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. *J. appl. Bacteriol.* 78(3): 237-244.
- Jaffe, K., F. Caetano, P. Sánchez, J. Hernández, L. Caraballo, J. Vitelli, W. Monsalve, B. Dorta y V. Rodríguez. 2001. Sensitivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. *Can. J. Zool.* 79: 1120-1124.
- Jang, E. y K. Nishijima. 1990. Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 19 (6): 1726 – 1731.
- Kadavy D., B. Plantz, C. Shaw, J. Myatt, T. Kokjohn y K. Nickerson. 1999. Microbiology of the oil fly, *Helaeomyia petroli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1477-1482.

- Kairu, G. 1996. Biochemical and pathogenic differences between Kenyan and Brazilian isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Plant pathology* 46: 239-246.
- Kloerper, J., C. Ruy y S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259 – 1266.
- Krechel, A., A. Faupel, J. Hallmann, A. Ulrich y G. Berg. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid&White) Chitwood. *Can. J. Microbiol.* 48: 772-786.
- Krieg, N. y Holt, J. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 1. 512-514 pp.
- Kuklinsky, J. 2003. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudio da interação endófitos-planta. Disertación doctoral. Universidad de São Paulo, Brasil. 189 pp.
- Kunitsky, C., G. Osterhout y M. Sasser. 2006. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the midi sherlock microbial identification system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Volumen III. 1-18 p.
- Kuzina, L., J. Peloquin, D. Vacek y T. Millar. 2004. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). *Current Microbiology* 48(2): 290-294.
- Lacava, P., W. Araújo, J. Marcon, W. Maccheroni y J. Azevedo. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology* 39: 55-59.
- Lacy, G. y F. Lukezic. 2003. *Pathogenic prokaryotes, plant pathology: concepts and laboratory exercises*. CRC Press LLC. 41-52.
- Laroca, S. y O. Mielke. 1975. Ensaio sobre ecologia de comunidade em Sphingidae na Serra Do Mar, Paraná, Brasil (Lepidoptera). *Rev. Brasil. de Biol.* 35(1): 1-19.
- Leu, L. 1993. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scald in Taiwan. *Plant Dis.* 77: 642-646.
- Li, W., W. Pira, D. Texeira, V. Miranda, A. Franco, M. Costa, C. He, P. Costa y J. Hartung. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from Citrus. *Plant Dis.* 85: 501 – 505.

- Lima, A., M. Quecine, M. Fungaro, F. Andreote, J. Maccheroni, W. Araújo, M. Silva-Filho, A. Pizzirani y J. Azevedo. 2005. Molecular characterization of beta-1-4-endoglucanasa from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (1): 57-65.
- Lomer, C., S. Eden-Green y E. Boa. 1992. Evidence for a forest origin of Sumatra disease of cloves. *Trop. Sci.* 32: 95 – 98.
- Lopes, S., S. Marcussi, Z. Torres, V. Souza, C. Fagan y C. França. 2003. Weeds as alternative host of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Plant Dis.* 87(5): 544 – 549.
- Lopes, J. 1999. Estudos com vectores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. *Laranja* 20(2): 329 – 344.
- Lopes, J. 1996. Mecanismos de transmissão of *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. *Laranja* 17 (1): 79-92.
- Maciel, M. 2005. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Tese PhD. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, Brasil. 132 pp.
- Maes, J. y C. Godoy. 1993. Catálogo de los Cicadellidae (Homoptera) de Nicaragua. *Rev. Nica. Ent.* 24: 5-34.
- Martin, W., M. Grisham, C. Kenerly, W. Sterling y P. Morgan. 1987. Microorganism associated with cotton fleahopper, *Pseudatomoscelis seriatus* (Heteroptera:Miridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80: 251-255.
- Marucci, R., R. Cavichioli y R. Zucchi. 2002. Espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) em pomares da região de Benedito, SP, com descrição de uma espécie nova *Acrogonia* Stål. *Rev. Bras. entomol.* 46(2): 149-164.
- Martorel, L., 1976. Annotated food plant catalogue of the insects of Puerto Rico. Agric. Exp. Sta., U.P.R.
- McInroy, J. y J. Kloepper. 1995. Survey of indigenous bacterian endophytes form cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173 (2): 337-342.
- Medina, S., Martorell L. y Maldonado, J. 2003. Catálogo de los nombres comunes de insectos y acarinos de importancia económica en Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico: 28-29.

- Meneguim, A., L. Akemi y R. Pedreira. 2001. Levantamento da fauna de homópteros vectores de *Xylella fastidiosa* em viveiros de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *PROMECAFE*, Boletim 91- 92 : 23 -24.
- Mesquita, F., C. Lopes y R. Ferreira. 2004. Diversidade de abelhas (Hymenoptera:Apoidea) em uma área de transição Cerrado-Amazônia. *Acta Amazonica* 34 (2): 319-328.
- Mitchell, P. 2004. Heteroptera as vectors of plant pathogens. *Neotrop. Entomol.* 33(5): 519-545.
- Mizell, R., P. Andersen, C. Tipping y B. Brodbeck, 2003. *Xylella fastidiosa* diseases and their leafhopper vectors. University of Florida: 1-7.
- Moler, F. 2001. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canoidea gives possible evidence for host-specificity and co-evolution of bacteria and hosts. *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* 51: 1343-1348.
- Moreno, C. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. SEA-manuales y tesis SEA vol. 1. Zaragoza, 84p.
- Monroig, M. 2007. Ecos del café. <<http://academic.uprm.edu/mmonroig/>>. August, 2007.
- Mundell, N. 2005. Phylogenetic analysis of Kentucky strains of *Xylella fastidiosa*. Tesis M.S. College Agriculture. University of Kentucky. Lexington. 103 pp.
- Muñoz, J. y J. Caballero. 2007. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. Programa de Ecología molecular y Microbiana. Universidad Nacional de México.<http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_13/Capitulo13.pdf>.
- Newman, K., R. Almeida, A. Purcell y S. Lindow, 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Microbiology* 101(5): 1737-1742.
- NBII/ISSG, 2005. Issg. Data base: Ecology of *Xylella fastidiosa*. Web cite University of California at Bekerley, <http://issg.appfa.auckland.ac.nz/database/species/ecology>.
- Nodarse, R. 2001. Estafilococos multirresistentes: uso del disco oxacillín como marcador de resistencia a antibióticos. *Rev. Cub. Med. Mil.* 30 (1): 7-10.
- Nomé, S., B. Raju, A. Goheen, G. Nyland y D. Docampo. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. *Phytopathology* 70: 271-290.

- Nuss, D. y A. Peterson. 1980. Expresión of Wound Tumor Virus Gene Products In Vivo and In Vitro. *J. Virol.* 34(2): 532-541.
- Ott, A. y G. Carvalho. 2001. Comunidade de Cigarrinhas (Hemiptera:Auchenorrhyncha) de uma Área de campo do Município de Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Neotropical Entomology* 30(2): 233-243.
- Ott, A., W. Azevedo, A. Ferran y G. Carvalho. 2006. Abundância e sazonalidad de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) en vegetação herbácea de pomar laranja doce, no município de Montenegro, Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre 96(4): 425-429.
- Pedreida, M. 2003. Levantamiento de cigarrinhas (Hemiptera:Cicadellidae) vectoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de cítricos do litoral Norte da bahia. Tesis M.S. Escuela Superior de Agricultura. PIRACICABA. São Pablo, Brasil. 75pp.
- Pooler, M. y J. Hartung. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol* 31 (6): 377 – 381.
- Pooler, M., I. Myung, J. Bentz, J. Sherald y J. Hartung, 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 25: 123-126.
- Purcell, A., 2005. A scientific and community Internet resource on plant disease caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*. <<http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/>>.
- Purcell, A. y A. Finlay. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology* 69: 393 – 395.
- Purcell, A., S. Saunders, M. Hedson, M. Grebus y M. Henry. 1999. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology* 89: 53-58.
- Purcell, A. y D. Hopkins. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. of Phytopa.* (34): 131-151.
- Raju, B., A. Gohenn y N. Frazier. 1983. Ocurrance of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. *Phytopathology* 73: 1309 – 1313.
- Ramos, J., 1957. A review of the auchenorynchous homoptera of Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 41 (1): 67 - 85.

Redak, R., A. Purcell, J. Lopes, M. Blua, R. Mizell y P. Andersen, 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Ann. Rev. Entomol.* 49: 243-270.

Reva, O., V. Smirnov y B. Peterson. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* 52: 101-107.

Rivera, G. 2006. Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis M.S. Departamento de Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. 85 pp.

Roberts, S., S. Eden-Green, P. Jones y D. Ambler. 1990. *Pseudomonas syzygii*, sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Syst. Appl. Microbiol.* 13 (1): 34 – 43.

Rodríguez, M., 2005. *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987) patógeno del café en los países tropicales. CICAFAE. <<http://apep-cr.tripod.com/Public/xylella.htm>>.

Rodríguez, M. 2003. *Xylella fastidiosa* (Wells) como patógeno de café en los países tropicales. *PROMECAFE*. Boletín Numero 9: 13-28.

Rodríguez, M., 2000. Tiempos de crisis: Los campesinos y el café en Puerto Rico durante el cambio de siglo y la Gran Depresión. *AGROALIMENTARIA* 11: 1-23.

Rodríguez, H. y R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17: 319-339.

Rojas, L., C. Godoy, P. Hanson, y L. Hilje. 2001. A survey of homopteran species (Auchenorrhyncha) in coffee, poro and laurel in shaded coffee plantations, in Turrialba, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 49(3): 981-989.

Sánchez, L., M. Zapata, R. Rodríguez y J. Beaver. 2003. Distribución y patogenicidad de *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp en el cultivo de café en Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 87 (3-4): 123-135.

Santos, C., J. Lopes, W. Araújo y J. Azevedo. 2004. Estudio molecular y biológico de la interacción entre bacterias endofíticas e insectos vectores (Insecta, Cicadellinae), de *Xylella fastidiosa*, el agente causal de la clorosis variegada de los citrus. V Encuentro Larionamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola (Redbio). Republica Dominicana. Junio 21 -25.

Sasser, M. 1990. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical Note # 101. MIDI. <www.midi-inc.com. ultima revision Julio 2006>. Enero 2007.

Schaad, N., E. Postnikova, G. Lacy, M. Fatmi y J. Chang. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. Piercei, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. multiplex subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. Pauca subsp. nov. *Syst Appl Microbiol* 27 (3): 290-300.

Schaad, N., D. Opgnorth y P. Gaush. 2002. Real-time polymerase chain reactions for one-hour on-site diagnosis of Pierce's Disease in grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology* 92: 721-728.

Schaad N., J. Jones y W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th. Edition. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA. 201-213 pp.

Schindler, C. y V. Schuhardt. 1964. Lysostaphin: A new bacteriolitic agent for the *Staphylococcus*. *Microbiol.* 51: 415-421.

Sezen, K., İ. Demir, H. Katl y Z. Demirbağ. 2005. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera:Scarabidae). *J. Microbiol.* 43 (5): 463 – 468.

Sessitsch, A., B. Reiter y G. Berg. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.* 50: 239-249.

Smitley, D. y N. Rothwell. 2003. How the use of chlorothalonil on golf courses impacts *Paenibacillus* sp., a pathogen of *Ataenius spretulus* (Coleoptera:Scarabidae). *J. Economic. Entomol.* 96(3): 792-797.

Spiteller, D., K. Dettner y W. Boland. 2000. Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of *N*-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biol. Chem.* 381: 755-762.

Sturz, A., B. Christie y B. Mathenson. 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.* 44: 162- 167.

Suslow, T., M. Schroth y M. Isaza. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *The Amer. Phytopa. Soc.* 72 (7): 917-919.

Tilak, K., N. Ranganayaki, K. Pal, R. De, A. Saxena, C. Shekhar, S. Mittal, A. Tripathi y B. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89 (1): 136-150.

Triplehorn, C. y N. Johnson. 2005. Borror and delong's introduction to the study of insects. 7 th edition. Pag. 268-332.

Tóth, E., É. Hell, G. Kovács, A. Borsodi y M. Márialigeti. 2006. Bacteria isolated form the different developmental stages and larval organs of the obligated parasitic fly, *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera:Sarcophagidae). *Microbial Ecology* (15): 13-21.

Urbina, N. 2001. A multivariate model for identification of bacteria using pyrolysis-GC/MS. uppsala University. Department of Mathematics. 34 pp.

United States Department of Agriculture USDA. 2004. Census of Agriculture 2002, Puerto Rico. USDA-NASS. Washington, DC. 219p.

Van der Wolf, J., J.G. Elphinstone, D. Stead, M. Metzler, P. Müller, A. Hukkanen y R. Karjalainen. 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* in relation to control bacterial ring rot. *Plant Research International B.V., Wageningen*. Report 95. 38 pp.

Varela, L., G. Rhonda, J. Smith y P. Philips. 2001. *Pierce's Disease*. Vol. publication 21600. Canada: regents of the University of California division of agriculture and natural resources.

Vargas, L., E. Sánchez, M. Vargas, A. Solorzano, F. Hernández, H. Iwasawa y E. Freer. 2002. Bacterial present in the xylem of coffee (Rubiaceae: *Coffea Arabica*) with "Crespera" disease. *Rev. Biol. Trop.* 50 (1): 45-48.

Vega, F., Pava-Ripoll, M., Posada, F. y Buyer, J. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J. Basic Microbiol.* 45 (5): 371-380.

Wang, Z., J. Comstock, E. Hatziloukas y N. Schaad. 1999. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albileans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathology* 48: 245 – 252.

Weber, O., L. Cruz, J. Baldani y J. Döbereiner. 2001. *Herbaspirillum* – Like bacteria in banana plants. *Braz. J. Microbiol.* 32(3): 201-205.

Wells, J.M. B.C. Raju, H.Y. Hung, W.G. Weisburg, P.L. Mandelco y D.J. Brenner. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 37: 136-143.

Wells, M., R. Gitaitis y F. Sanders. 2002. Association of tobacco thrips *Frankliniella fusca* (Thysanoptera:Thripidae) with two species of bacteria of the genus *Pantoea*. *Annals of the Entomological Society of America* 95(6): 719-723.

Yamamoto, P. y S. Gravena. 2000. Leafhoppers and Psyllids (Homoptera) species and abundance in citrus orchards. *An. Soc. Entomol. Bras.* 29 (1): 169 – 176.

Yamamoto, P., S. Roberto, W. Pria, M. Felipe y E. De Freitas. 2002. Species and population dynamics of sharpshooters in nursery citrus, located at Mogi-Guaçu, Sp. *Rev. Bras. Furtic.* 24(2) : 389-394.

Yaman, M., R. Nalçacioğlu y Z. Demirbağ. 2002. Studies on bacterial flora in the population of the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. (Lep., Arctiidea). *Journal of Applied Entomology* 126 (9): 470-474.

Zapata, M. 2007. Investigación sobre la identificación de la bacteria *Xylella fastidiosa* y otras endofitas asociadas al sistema vascular en café y cítricos en Puerto Rico. Memorias Foro sobre café sostenible en Puerto Rico. 39-41.

Zinniel, D., P. Lambrecht, N. Harris, Z. Feng, D. Kuczmariski, P. Higley, C. Ishimaru, A. Arunakumari, G. Barletta y A. Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2198-2208.

Zurdo, J., E. Velásquez, M. Lorite, G. Brelles, E. Schröder, E. Bedmar, P. Mateos y E. Martinez. 2004. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *Syst. and Appl. Microbiol.* 27:469-477.

ANEXOS

Anexo 1. Abundancia mensual y número total de especies de insectos (Hemiptera:Auchenorrhyncha) colectados en Adjuntas P.R., capturadas durante el período de Junio a Noviembre de 2006.

| ESPECIE | Junio 12 | Junio 26 | Julio 10 | Julio 25 | Agosto 7 | Agosto 21 | Septiembre 5 | Septiembre 18 | Octubre 2 | Octubre 16 | Octubre 30 | Noviembre 13 | TOTAL |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|---------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 407 | 559 | 416 | 449 | 442 | 438 | 285 | 234 | 263 | 305 | 376 | 291 | 4465 |
| <i>Hortensia similis</i> | 6 | | 2 | | 3 | 3 | | 3 | | | | | 17 |
| <i>Agaliopsis pepino</i> | 38 | 5 | 5 | | 1 | | | | | | 2 | 4 | 55 |
| <i>Agalia pulchra</i> | 22 | 12 | 26 | 25 | 21 | 14 | 9 | 5 | 12 | 6 | 10 | | 162 |
| Cicadellidae sp1 | 5 | | 3 | 4 | 3 | | 8 | 1 | 1 | | | 1 | 26 |
| Cicadellidae sp3 | | | | 4 | | | | | | | | | 4 |
| <i>Nesshorinus sp</i> | 9 | 1 | 3 | 7 | 2 | 2 | | | | 1 | | 1 | 26 |
| <i>Achilidae sp1</i> | 4 | 4 | | | 1 | 5 | | | | 2 | 2 | | 18 |
| <i>Tropiduchidae sp1.</i> | | | 1 | | 1 | | | | | 1 | | | 3 |
| <i>Bothriocera sp.</i> | 70 | 41 | 23 | 8 | 7 | 2 | | | 3 | 1 | | | 155 |
| TOTAL | 561 | 622 | 479 | 497 | 481 | 464 | 302 | 243 | 279 | 316 | 388 | 297 | 4931 |

Anexo 2. Abundancia mensual y número total de especies de insectos (Hemiptera:Auchenorrhyncha) colectados en Juana Díaz P.R., capturadas durante el período de Junio a Noviembre de 2006.

| ESPECIE | Junio 12 | Junio 26 | Julio 10 | Julio 25 | Agosto 7 | Agosto 21 | Septiembre 5 | Septiembre 18 | Octubre 2 | Octubre 16 | Octubre 30 | Noviembre 13 | TOTAL |
|---------------------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|-----------|--------------|---------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 110 | 71 | 98 | 75 | 62 | 74 | 48 | 86 | 86 | 67 | 61 | 61 | 899 |
| <i>Hortensia similis</i> | 5 | 2 | 4 | 2 | | | | 2 | 1 | 1 | | | 17 |
| <i>Apogonalia spp</i> | 6 | 2 | 6 | 4 | 2 | 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | | 34 |
| <i>Cicadellidae sp1</i> | | | | | 2 | | | 1 | | | | | 3 |
| <i>Cicadellidae sp2</i> | 2 | 1 | | 1 | | | 2 | | | | | | 6 |
| <i>Scaphytopius neloricatus</i> | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | | 3 | 1 | | 1 | 1 | 4 | 18 |
| <i>Agallia pulchra</i> | 3 | 5 | 4 | 3 | 8 | 2 | 2 | 1 | 2 | | 2 | 3 | 35 |
| <i>Agaliopsis pepino</i> | | | | | 4 | | | | | | | | 4 |
| <i>Achilidae sp1</i> | 1 | | 1 | | 2 | | | 3 | | 2 | 2 | | 11 |
| <i>Nesshorinus sp</i> | 1 | 1 | | | | | 1 | | | | | | 3 |
| <i>Bothriocera sp.</i> | 8 | 26 | 9 | 10 | 22 | 12 | 15 | 10 | 11 | 7 | 11 | 7 | 146 |
| TOTAL | 138 | 110 | 125 | 97 | 104 | 93 | 74 | 107 | 103 | 81 | 78 | 75 | 1185 |

Anexo 3. Abundancia mensual y número total de especies de insectos (Hemiptera:Auchenorrhyncha) colectados en Yauco P.R., Finca Villa Cecilia, durante el período de Junio a Noviembre de 2006.

| ESPECIE | Junio 12 | Junio 26 | Julio 10 | Julio 25 | Agosto 7 | Agosto 21 | Septiembre 5 | Septiembre 18 | Octubre 2 | Octubre 16 | Octubre 30 | Noviembre 13 | TOTAL |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|------------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|------------|
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 30 | 19 | 29 | 31 | 20 | 16 | 28 | 38 | 21 | 16 | 24 | 29 | 301 |
| <i>Hortensia similis</i> | 7 | 5 | | 1 | | | | | 2 | | 2 | 3 | 20 |
| <i>Agalliopsis pepino</i> | 31 | 6 | | 3 | | 3 | | | | | | | 43 |
| <i>Agallia pulchra</i> | 7 | 16 | 11 | 18 | 26 | 4 | 20 | 15 | 6 | 13 | 4 | 12 | 152 |
| Cicadellidae sp1 | 11 | | | | | | | | | | | | 11 |
| Cicadellidae sp3 | 3 | | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | 6 |
| <i>Nesshorinus sp</i> | 4 | | | | | | | | | | | | 4 |
| <i>Tropiduchidae sp1.</i> | | | 1 | 3 | | | | 1 | | | | | 5 |
| <i>Bothriocera sp.</i> | 18 | 6 | 13 | 12 | 9 | 11 | 13 | 4 | 3 | 2 | 2 | 3 | 93 |
| TOTAL | 111 | 52 | 55 | 68 | 55 | 34 | 62 | 58 | 32 | 32 | 32 | 47 | 638 |

Anexo 4. Abundancia mensual y número total de especies de insectos (Hemiptera:Auchenorrhyncha) colectados en Yauco P.R., Finca Sierra Alta, capturadas durante el período de Junio a Noviembre de 2006.

| ESPECIE | Junio 12 | Junio 26 | Julio 10 | Julio 25 | Agosto 7 | Agosto 21 | Septiembre 5 | Septiembre 18 | Octubre 2 | Octubre 16 | Octubre 30 | Noviembre 13 | TOTAL |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|------------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|------------|
| <i>Apogonalia spp</i> | 31 | 29 | 37 | 47 | 35 | 32 | 23 | 16 | 21 | 17 | 22 | 10 | 320 |
| <i>Caribovia coffeacola</i> | 2 | | | 1 | | 2 | | | 3 | 1 | 1 | 1 | 11 |
| <i>Hortensia similis</i> | 2 | 4 | 2 | 3 | 1 | | | | | 1 | 1 | | 14 |
| <i>Agalliopsis pepino</i> | 3 | 6 | 24 | 24 | 15 | | 23 | | 24 | 14 | 21 | | 154 |
| <i>Agallia pulchra</i> | | 2 | | | | | | 12 | | | | 2 | 16 |
| <i>Achildae sp1</i> | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| <i>Tropiduchidae sp1.</i> | | | 1 | 1 | 5 | 4 | 3 | | | | | | 14 |
| <i>Bothriocera sp.</i> | 24 | 3 | 4 | | 11 | 10 | 14 | 27 | 19 | 9 | 11 | 9 | 141 |
| TOTAL | 63 | 44 | 68 | 76 | 67 | 48 | 63 | 55 | 67 | 42 | 56 | 22 | 671 |

Anexo 5. Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Hortensia similis*

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------|----------|----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 3926 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Redonda | Entero | Plana | 3 | 8 | + | - | + | + | | X | |
| 4052 | <i>H. similis</i> | C/S | Amarillo | Redonda margen elevado | Entero | Elevada | 6 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4053 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Forma L | Entero | Umbonada | 5 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4054 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Compleja | Ramificada | Plana | 25 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4055 | <i>H. similis</i> | C/S | Amarillo | Redonda | Entero | Elevada | 3 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4056 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Forma L | Entero | Elevada | 11 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4057 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Redonda | Entero | Elevada | 6 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 3928 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Redonda margen elevado | Entero | Elevada | 6 | 1 | + | - | - | + | | | |
| 4022 | <i>H. similis</i> | C/S | Amarillo | Concéntrica | Entero | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4058 | <i>H. similis</i> | C/S | Amarillo | Forma L | Ondulado | Embonada | 7 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4059 | <i>H. similis</i> | C/S | Rosa | Redonda | Entero | Elevada | 4 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4060 | <i>H. similis</i> | C/S | Blanco | Redonda | Entero | Elevada | 3 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4061 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Redonda | Entero | Elevada | 3 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4062 | <i>H. similis</i> | C/S | Blanco | Redonda | Entero | Elevada | 2 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4063 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Forma L | Entero | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | | |
| 4064 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Filiforme | Ondulado | Plana | 6 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4065 | <i>H. similis</i> | C/S | Amarillo | Irregular | lobado | Umbonada | 3 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4066 | <i>H. similis</i> | C/S | Naranja | Redonda | Entero | Elevada | 3 | 1 | - | + | - | + | | X | X |
| 4067 | <i>H. similis</i> | C/S | Rosa | Redonda margen elevado | Ondulado | Elevada | 10 | 3 | - | + | - | + | | | |
| 4068 | <i>H. similis</i> | C/S | Blanco | Concéntrica | Ondulado | Plana | 8 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4069 | <i>H. similis</i> | C/S | Blanco | Irregular expandida y | Lobado | Plana | 5 | 5 | - | + | - | + | | | |
| 4070 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Concéntrica | Ondulado | Plana | 9 | 2 | - | + | - | + | X | | |
| 4071 | <i>H. similis</i> | C/S | Rosa | Redonda margen escalonado | Lobado | Plana | 13 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4072 | <i>H. similis</i> | C/S | Rosa | Forma L | Entero | Plana | 10 | 2 | - | + | - | + | | | |
| 4073 | <i>H. similis</i> | C/S | Rosa | Redonda margen elevado | Ciliado | Elevada | 6 | 62 | - | + | + | + | | | |
| 4074 | <i>H. similis</i> | C/S | Amarillo | Irregular | Lanoso | Elevada | 16 | 2 | - | + | - | + | | X | X |

Anexo 5. (Cont...) Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Hortensia similis*.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------|----------|----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | Mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 4076 | <i>H. similis</i> | C/S | Naranja | Redonda margen elevado | Irregular | Plana | 11 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4077 | <i>H. similis</i> | C/S | Naranja | Concéntrica | Lobado | Plana | 9 | 2 | - | + | + | + | | | |
| 4078 | <i>H. similis</i> | C/S | Crema | Concéntrica | Ondulado | Elevada | 10 | 2 | + | - | - | + | X | | |
| 4079 | <i>H. similis</i> | C/S | Blanco | Concéntrica | Ondulado | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4080 | <i>H. similis</i> | C/D | Blanco | Compleja | Ondulado | Plana | 19 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4081 | <i>H. similis</i> | C/D | Amarillo | Filiforme | Lodabo | Plana | 21 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4082 | <i>H. similis</i> | C/D | Naranja | Rizoide | ondulado | Plana | 50 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4011 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Amarillo | Forma L | Entero | Umbonada | 4 | 2 | + | - | - | + | | X | |
| 4012 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Blanco | Redonda margen escalonado | Irregular | Elevada | 5 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4442 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Forma L | Ondulado | Elevada | 6 | 3 | - | + | - | + | | X | |
| 4443 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Amarillo | Redonda | Entero | Elevada | 7 | 2 | | | | | | X | |
| 4020 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Blanco | Redonda margen elevado | Entero | Elevada | 10 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4083 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Redonda | Entero | Elevada | 3 | 6 | + | - | - | + | | X | |
| 4021 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Arrugada | Ondulado | Plano | 11 | 3 | + | - | + | + | X | | |
| 4084 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Blanco | Arrugada | Ondulado | Elevada | 8 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4085 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Redonda | Entero | Plana | 3 | 4 | - | + | + | + | X | | |
| 4086 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Amarillo | Forma L | Entero | Convexa | 4 | 2 | - | + | - | + | X | | |
| 4087 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Amarillo | Concéntrica | Entero | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4088 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Blanco | Redonda margen elevado | Entero | Elevada | 8 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4089 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Rosa | Redonda margen escalonado | Ondulado | Elevada | 6 | 2 | - | + | - | + | | X | |
| 4090 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Rosa | Redonda margen escalonado | Lobado | Umbonada | 11 | 1 | - | + | + | + | | X | X |
| 4091 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Ocupa | Toda | La | caja | | 1 | + | - | + | + | | X | |
| 4092 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Amarillo | Arrugada | Ondulado | Elevada | 15 | 1 | - | + | - | + | | | |

Anexo 5. (Cont...) Listado de bacterias aisladas de tejidos de *Hortensia similis*.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------|----------|----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | Mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 4094 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Blanco | Concéntrica | Ondulado | Umbonada | 11 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4095 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Arrugada | Entero | Elevada | 4 | 12 | - | + | - | + | | | |
| 4096 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Rosa | Arrugada | Entero | Plana | 4 | 4 | + | - | - | + | | X | |
| 4097 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Irregular y expandida | Lobado | Plana | 17 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4098 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Redonda margen escalonado | Entero | Umbonada | 6 | 2 | + | - | + | + | | X | |
| 4099 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Blanco | Redonda | Ondulado | Plana | 12 | 4 | - | + | - | + | X | | |
| 4100 | <i>H. similis</i> | Cu/S | Crema | Redonda | | Elevada | 5 | 3 | + | - | - | + | X | | |
| 4017 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Café | Arrugada | Entero | Umbonada | 5 | 1 | + | - | - | + | | | |
| 4101 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Blanco | Redonda | Entero | Elevada | 9 | 2 | - | + | - | + | | | |
| 4102 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Amarillo | Redonda | Entero | Plana | 3 | 1 | - | + | + | + | X | | |
| 4103 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Redonda | Entero | Convexa | 4 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4104 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 14 | 1 | - | + | - | + | | X | X |
| 4105 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Amarillo | Irregular and expandida | Ondulado | Elevada | 6 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4023 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Compleja | Ondulado | Plana | 8 | 9 | + | - | - | + | | | |
| 4106 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Redonda margen elevado | Entero | Elevada | 6 | 11 | - | + | + | + | | X | |
| 4107 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Forma L | Ondulado | Elevada | 3 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4108 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Amarillo | Rizoide | Ondulado | Plana | 5 | 3 | - | + | - | + | | | |
| 4024 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Filiforme | Ondulado | Elevada | 8 | 1 | + | - | - | + | X | | |
| 4109 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Amarillo | Forma L | Entero | Umbonada | 5 | 1 | - | + | - | + | | X | X |
| 4110 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Naranja | Filiforme | Lobado | Plana | 11 | 4 | + | - | - | + | | X | |
| 4111 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Redonda | Ondulado | Plana | 5 | 2 | + | - | + | + | | | |
| 4112 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Filiforme | Lobado | Plana | 21 | 1 | + | - | - | + | | | |
| 4113 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Naranja | Filiforme | Lobado | Elevada | 15 | 1 | + | - | + | + | | X | |
| 4114 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Rosa | Forma L | Entero | Umbonada | 7 | 1 | - | + | - | + | | X | X |
| 4115 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Amarillo | Filiforme | Ondulado | Plana | 17 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4116 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Blanco | Filiforme | Lobado | Plana | 9 | 1 | + | - | - | + | | | |

Anexo 5. (Cont...) Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Hortensia similis*.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|-----------|--------|---------|----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 4118 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Forma L | Entero | Plana | 9 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4119 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Redonda | Entero | Elevada | 13 | 7 | + | - | - | + | X | | |
| 4120 | <i>H. similis</i> | Cu/D | Crema | Filiforme | Lobado | Plana | 8 | 3 | - | + | + | + | | | |

¹ Origen: C/S = Tratamiento cabeza sin desinfectar; C/D = Cabeza desinfectada; Cu/S = Cuerpo sin desinfectar; Cu/D = Cuerpo desinfectado.

² Morfología de la colonia: Color = color de la colonia; Conf = configuración; Mar = Margén; Elev = Elevación; mm = Diámetro en milímetros.

³ Frec: Frecuencia de aislamiento.

⁴ Pruebas: KOH = Prueba de KOH; Gram = Tinción diferencial; Oxid = Oxidasa; Cata. = Catalasa.

⁵ Morfología celular: Coco = Células en forma de coco; Bac = Células en forma de bacilo; Esp = Presencia de esporas.

⁶ + = Resultado positivo; - = Resultado negativo.

Anexo 6. Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Caribovia coffeacola*.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|----------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------|------------|------------|-----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 4122 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 15 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4032 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 8 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4033 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Naranja | Forma L | Ondulado | Umbonada | 3 | 4 | + | - | - | + | X | | |
| 4123 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Crema | Redonda margen elevado | Entero | Elevada | 1.5 | 23 | + | - | - | + | | X | |
| 4124 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Naranja | Redonda margen escalonado | Lobado | Plana | 16 | 1 | + | - | + | + | | X | |
| 4125 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Crema | Filiforme | Ondulado | Plana | 9 | 1 | + | - | + | + | | X | |
| 4126 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 11 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4127 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Rosa | Redonda | Entero | Forma-gota | 3 | 3 | - | + | + | + | | X | |
| 4128 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Crema | Redonda | Entero | Convexa | 4 | 2 | - | + | - | + | | | |
| 4129 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Blanco | Filamentosa | Ramificado | Plana | 15 | 6 | - | + | + | + | | | |
| 4130 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Blanco | Redonda | Entero | Plana | 3 | 2 | - | + | - | - | | | |
| 4131 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Amarillo | Filiforme | Lobado | Elevada | 16 | 1 | - | + | - | - | X | | |
| 4132 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Crema | Filamentosa | Lobado | Plana | 18 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4133 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Naranja | Arrugado | Entero | Plana | 20 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4134 | <i>C. coffeacola</i> | C/S | Amarillo | Redonda margen elevado | Ondulado | Elevada | 3 | 8 | - | + | - | + | | | |
| 4135 | <i>C. coffeacola</i> | C/D | Crema | Concéntrica | Lobado | Plana | 6 | 2 | - | + | - | + | | X | |
| 4136 | <i>C. coffeacola</i> | C/D | Crema | Redonda | Entero | Plana | 2 | 16 | + | - | - | + | X | | |
| 4137 | <i>C. coffeacola</i> | C/D | Blanco | Irregular disperso y | Ondulado | Plana | 25 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4138 | <i>C. coffeacola</i> | C/D | Blanco | Redonda margen elevado | Ciliado | Elevada | 4 | 2 | - | + | - | + | | | |
| 4139 | <i>C. coffeacola</i> | C/D | Amarillo | Arrugado | Ondulado | Elevada | 3 | 21 | + | - | - | + | X | | |
| 4140 | <i>C. coffeacola</i> | C/D | Amarillo | Arrugado | Ondulado | Plana | 19 | 1 | - | + | - | + | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4028 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Crema | Filiforme | Ondulado | Plana | 12 | 1 | + | - | + | + | | X | |
| 4029 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Blanco | Arrugado | Entero | Elevada | 12 | 7 | + | - | + | + | | X | |
| 4030 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Crema | Redonda | Entero | Elevada | 9 | 300 | + | - | + | + | | X | |

Anexo 6. (Cont...) Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Caribovia coffeacola*.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|----------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------|------------|----------|----|-----|-------------------|----------------------|------|-------|------|---------------------------------|-----|--|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | KOH | | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp | |
| 4141 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Naranja | Redonda margen elevado | Ondulado | Elevada | 6 | 1 | - | + | - | + | | X | | |
| 4142 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Blanco | Filamentosa | Ciliado | Plana | 17 | 1 | + | - | + | + | | X | | |
| 4143 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Crema | Redonda | Entero | Plana | 2 | 300 | + | - | + | + | | | | |
| 4144 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Crema | Concéntrica | Ondulado | Elevada | 5 | 3 | + | - | - | + | X | | | |
| 4145 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Blanco | Redonda margen elevado | Entero | Plana | 7 | 1 | - | + | - | + | | X | | |
| 4146 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Amarillo | Rizoide | Como-hilo | Elevada | 9 | 4 | + | - | + | + | X | | | |
| 4147 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Blanco | Filamentosa | Ramificado | Plana | 32 | 4 | - | + | - | + | | | | |
| 4148 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Rosa | Arrugado | Entero | Elevada | 11 | 1 | - | + | - | - | | | | |
| 4149 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Naranja | Redonda margen escalonado | Lobado | Elevada | 6 | 2 | - | + | - | + | | | | |
| 4150 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/S | Amarillo | Redonda margen elevado | Entero | Plana | 10 | 1 | + | - | - | + | | | | |
| 3929 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Amarillo | Redonda | Entero | Convexa | 4 | 1 | + | - | - | + | X | | | |
| 4025 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Amarillo | Forma L | Entero | Umbonada | 4 | 1 | + | - | - | + | X | | | |
| 4151 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Amarillo | Compleja | Ondulado | Elevada | 8 | 5 | - | + | - | + | | X | | |
| 4026 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Amarillo | Redonda | Entero | Plana | | 2 | + | - | - | + | X | | | |
| 4152 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Blanco | Filamentosa | Ciliado | Plana | 30 | 4 | - | + | - | + | | X | X | |
| 4027 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Crema | Arrugado | Ondulado | Elevada | 10 | 1 | + | - | + | + | | X | | |
| 4153 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Amarillo | Compleja | Ondulado | Elevada | 3 | 1 | + | - | + | + | | | | |
| 4154 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Amarillo | Irregular disperso y | Lobado | Elevada | 3 | 50 | + | - | + | + | | X | | |
| 4155 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | Blanco | Forma L | Lobado | Plana | 12 | 1 | - | + | + | + | | X | | |
| 4156 | <i>C. coffeacola</i> | Cu/D | amarillo | Redonda margen escalonado | Lanoso | Elevada | 17 | 5 | + | - | - | + | | X | | |

¹ Origen: C/S = Tratamiento cabeza sin desinfestar; C/D = Cabeza desinfestada; Cu/S = Cuerpo sin desinfestar; Cu/D = Cuerpo desinfestado.

² Morfología de la colonia: Color = color de la colonia; Conf = configuración; Mar = Margén; Elev = Elevación; mm = Diámetro en milímetros.

³ Frec: Frecuencia de aislamiento.

⁴ Pruebas: KOH = Prueba de KOH; Gram = Tinción diferencial; Oxid = Oxidasa; Cata. = Catalasa.

⁵ Morfología celular: Coco = Células en forma de coco; Bac = Células en forma de bacilo; Esp = Presencia de esporas.

⁶ + = Resultado positivo; - = Resultado negativo.

Anexo 7. Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Apogonalia* spp.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|------------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-----------|---------------------|----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 4158 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Blanco | Arrugada | Ondulado | Plana | 14 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4159 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Blanco | Arrugada | Entero | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4160 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Blanco | Filiforme | Ondulado | Elevada | 9 | 2 | + | - | + | + | | X | |
| 4161 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Redonda margen elevado | Entero | Plana | 7 | 3 | - | + | + | + | | X | |
| 4162 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Filiforme | Ondulado | Plana | 8 | 2 | + | - | + | + | | X | |
| 4358 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Amarillo | Compleja | Ondulado | Elevada | 9 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4359 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Compleja | Ondulado | Convexa | 5 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4360 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Blanco | Rizoide | Ondulado | Dentro del medio | 19 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4361 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Rosa | Compleja | Ondulado | Umbonada | 3 | 1 | - | + | - | - | | | |
| 4362 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | crema | toda | La | Caja | | | - | + | - | + | | | |
| 4363 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Redonda | Entero | Plana | 11 | 1 | + | - | + | + | | | |
| 4364 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Redonda con margen elevado | Entero | Elevada | 5 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4365 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Concéntrica | Entero | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | | |
| 4365 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Crema | Arrugado | Liso | Plana | 7 | 1 | + | - | - | + | | | |
| 4366 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Blanco | Irregular and disperso | Ondulado | Plana | 6 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4163 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/D | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 6 | 33 | - | + | - | + | | | |
| 4164 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/D | Amarillo | Arrugada | Entero | Elevada | 7 | 2 | - | + | + | + | | | |
| 4165 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/D | Crema | Concéntrica | Irregular | Umbonada | 10 | 3 | + | - | + | + | | X | |
| 4367 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/D | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 38 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4364 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/D | Blanco | Forma L | Ondulado | Plana | 9 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4166 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Crema | Forma L | Entero | Elevada | 12 | 2 | + | - | + | + | | X | |
| 4167 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Blanco | Concéntrica | Lobado | Plana | 7 | 1 | + | - | - | - | | X | |
| 4168 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Amarillo | Forma L | Entero | Elevada | 4 | 9 | + | - | - | + | | X | |
| 4169 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Amarillo | Redonda | Entero | Elevada | 7 | 4 | + | - | + | + | X | | |
| 4170 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Naranja | Compleja | Ondulado | Elevada | 6 | 5 | + | - | + | + | | X | |
| 4171 | <i>Apogonalia</i> spp. | C/S | Amarillo | Forma L | Ondulado | Umbonada | 5 | 3 | - | + | - | + | | X | |

Anexo 7. (Cont...) Listado de bacterias aisladas de los tejidos de *Apogonalia* spp.

| No | Especie | Origen ¹ | Morfología de la colonia ² | | | | | Frec ³ | Pruebas ⁴ | | | | Morfología celular ⁵ | | |
|------|------------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------------|-----------|----------|----|-------------------|----------------------|------|------|-------|---------------------------------|-----|-----|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Bac | Esp |
| 4174 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Crema | Filiforme | Irregular | Plana | 6 | 2 | - | + | - | + | | | |
| 4175 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Rosa | Filiforme | Ondulado | Elevada | 7 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4178 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Blanco | Filamentosa | Irregular | Plana | 45 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4179 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Amarillo | Compleja | Lobado | Elevada | 8 | 20 | + | - | - | + | | X | |
| 4365 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Crema | Concéntrica | Entero | Plana | 19 | 2 | - | + | + | + | | | |
| 4366 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Crema | Redonda con margen elevado | Entero | Plana | 2 | 9 | - | + | + | + | | | |
| 4367 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Naranja | Filiforme | Ondulado | Elevada | 3 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4368 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Naranja | Filiforme | Lobado | Plana | 10 | 5 | + | - | - | + | | | |
| 4369 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Amarillo | Forma L | Lobado | Elevada | 4 | 1 | - | + | + | + | | | |
| 4370 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Crema | Redonda con margen elevado | Entero | Elevada | 3 | 3 | - | + | - | + | | | |
| 4371 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/S | Crema | Forma L | Entero | Elevada | 3 | 3 | - | + | - | + | | | |
| 4372 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4176 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Blanco | Rizoide | Lobado | Elevada | 10 | 5 | - | + | + | + | | X | |
| 4177 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Crema | Forma L | Entero | Elevada | 11 | 6 | + | - | - | + | X | | |
| 4178 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 6 | 33 | - | + | - | + | | | |
| 4179 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Amarillo | Arrugada | Entero | Elevada | 7 | 2 | - | + | + | + | | | |
| 4180 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Crema | Redonda | Irregular | Plana | 65 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4181 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Blanco | Filiforme | Ondulado | Elevada | 12 | 4 | - | + | + | + | | | |
| 4182 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Amarillo | Irregular | Lobado | Umbonada | 10 | 2 | - | + | + | + | | | |
| 4183 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Amarillo | Arrugada | Ondulado | Plana | 8 | 1 | - | + | - | + | | | |
| 4184 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Blanco | Filamentosa | Irregular | Plana | 48 | 3 | + | - | - | + | X | | |
| 4185 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Naranja | Redonda | Entero | Plana | 7 | 7 | - | + | - | + | | | |
| 4186 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cu/D | Amarillo | Redonda | Ondulado | Elevada | 14 | 4 | - | + | - | + | | | |

¹ Origen: C/S = Tratamiento cabeza sin desinfectar; C/D = Cabeza desinfectada; Cu/S = Cuerpo sin desinfectar; Cu/D = Cuerpo desinfectado.

² Morfología de la colonia: Color = color de la colonia; Conf = configuración; Mar = Margén; Elev = Elevación; mm = Diámetro en milímetros.

³ Frec: Frecuencia de aislamiento.

⁴ Pruebas: KOH = Prueba de KOH; Gram = Tinción diferencial; Oxid = Oxidasa; Cata. = Catalasa.

⁵ Morfología celular: Coco = Células en forma de coco; Bac = Células en forma de bacilo; Esp = Presencia de esporas.

⁶ + = Resultado positivo; - = Resultado negativo.

Anexo 8. Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia de 5%, para número de colonas por especie de insecto y tratamiento.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|---------------|----------|---------------|-------------|---------------|
| Modelo | 623.42 | 5 | 124.68 | 5.36 | 0.0322 |
| Insecto | 155.17 | 2 | 77.58 | 3.34 | 0.1061 |
| Tratamiento | 468.25 | 3 | 156.08 | 6.71 | 0.0241 |
| Error | 139.50 | 6 | 23.25 | | |
| Total | 762.92 | 11 | | | |

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=10.46095

Error: 23.2500 gl: 6

| Insec | Medias | n | |
|----------------|--------|---|---|
| C. coffeacola | 11.50 | 4 | A |
| Apogonalia spp | 15.00 | 4 | A |
| H. similis | 20.25 | 4 | A |

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=13.62989

Error: 23.2500 gl: 6

| Trat. | Medias | n | | |
|-------|--------|---|---|---|
| C/D | 5.00 | 3 | A | |
| Cu/D | 17.33 | 3 | A | B |
| Cu/S | 19.00 | 3 | | B |
| C/S | 21.00 | 3 | | B |

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Tratamientos: C/S = cabeza sin desinfestar; C/D = Cabeza desinfestada; Cu/S = Cuerpo sin desinfestar; Cu/D = Cuerpo desinfestado

Anexo 9. Bacterias aisladas de tres especies de vectores potenciales de *X. fastidiosa*, identificados por ácidos grasos.

| No. Bacteria | Especie | Tejido de aislamiento | Identidad ¹ | Probabilidad (%) ² |
|--------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| 4091 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 75.7 |
| 4097 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 84.7 |
| 4096 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | <i>Bacillus circulans</i> | 71.0 |
| 4117 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfestado | <i>Bacillus pumilus</i> | 71.9 |
| 4155 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfestado | <i>Bacillus cereus</i> | 86.3 |
| 4159 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cabeza sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 81.8 |
| 4161 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cabeza sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 83.6 |
| 4164 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cabeza sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 87.4 |
| 4168 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cabeza desinfestada | <i>Bacillus pumilus</i> | 80.8 |
| 4171 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 79.4 |
| 4175 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 82.4 |
| 4178 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | <i>Bacillus pumilus</i> | 82.0 |
| 4176 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo desinfestado | <i>Bacillus pumilus</i> | 83.2 |
| 4183 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo desinfestado | <i>Bacillus pumilus</i> | 56.6 |
| 4185 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo desinfestado | <i>Bacillus pumilus</i> | 62.8 |
| 4186 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo desinfestado | <i>Bacillus pumilus</i> | 78.1 |
| 3928 | <i>H. simills</i> | Cabeza sin desinfestar | <i>Microbacterium chocolatum</i> | 58.5 |
| 4057 | <i>H. simills</i> | Cabeza sin desinfestar | <i>Microbacterium laevaniformans</i> | 67.2 |
| 4078 | <i>H. simills</i> | Cabeza sin desinfestar | <i>Microbacterium laevaniformans</i> | 47.9 |
| 4083 | <i>H. simills</i> | Cuerpo sin desinfestar | <i>Mircrobacterium lacticum</i> | 87.5 |
| 4112 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfestado | <i>Microbacterium barkeri</i> | 74.8 |

Anexo 9. (Cont...) Bacterias aisladas de tres especies de vectores potenciales de *X. fastidiosa*, identificados por ácidos grasos.

| No. Bacteria | Especie | Tejido de aislamiento | Identidad ¹ | Probabilidad (%) ² |
|--------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| 4051 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Microbacterium estearomaticum</i> | 87.6 |
| 4150 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfectar | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 46.4 |
| 4144 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfectar | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 75.7 |
| 3929 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 45.0 |
| 4137 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza desinfectado | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 74.0 |
| 4153 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 66.6 |
| 4154 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 65.2 |
| 4124 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Pasteurella pneumotropica</i> | 54.7 |
| 4126 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Pasteurella pneumotropica</i> | 59.0 |
| 4136 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza desinfectada | <i>Pasteurella pneumotropica</i> | 51.0 |
| 4131 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza desinfectada | <i>Micrococcus luteus</i> | 60.0 |
| 4139 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza desinfectada | <i>Micrococcus luteus</i> | 77.6 |
| 4156 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza desinfectada | <i>Micrococcus luteus</i> | 48.9 |
| 4098 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | 39.8 |
| 4084 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfectar | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | 62.8 |
| 4033 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza sin desinfectar | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | 55.6 |
| 4119 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Rhizobium radiobacter</i> | 89.5 |
| 4177 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo desinfectado | <i>Rhizobium radiobacter</i> | 87.9 |
| 4123 | <i>C. coffeacola</i> | Cabeza desinfectada | <i>Vibrio campbellii</i> | 47.0 |
| 4153 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Vibrio harveyi</i> | 52.9 |
| 4111 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Paenibacillus polymza</i> | 53.5 |
| 4110 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfectado | <i>Paenibacillus polymza</i> | 53.5 |

¹ Identificación mediante análisis GC-FAME (Cromatografía de gases de ácidos grasos).

² Probabilidad dada por el análisis GC-FAME (Cromatografía de gases de ácidos grasos).

Anexo 10. Lista de cultivos bacterianos probados mediante la prueba de ELISA para la detección de *X. fastidiosa*

| No. Bacteria | Insecto | Tejido de aislamiento | Resultado |
|---------------------|----------------------|------------------------------|------------------|
| 4022 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfestar | Negativo |
| 4054 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfestar | Negativo |
| 3928 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfestar | Negativo |
| 4063 | <i>H. similis</i> | Cabeza sin desinfestar | Negativo |
| 4011 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | Positivo |
| 4012 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4020 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4013 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4021 | <i>H. similis</i> | Cuerpo sin desinfestar | Positivo |
| 4024 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfestado | Negativo |
| 4116 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfestado | Positivo |
| 4017 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfestado | Negativo |
| 4023 | <i>H. similis</i> | Cuerpo desinfestado | Negativo |
| 4143 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4028 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfestar | Positivo |
| 4029 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfestar | Positivo |
| 4030 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfestar | Positivo |
| 4155 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4025 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfestado | Negativo |
| 4039 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4026 | <i>C. coffeacola</i> | Cuerpo desinfestado | Negativo |

Anexo 10. (Cont...) Lista de cultivos bacterianos probados mediante la prueba de ELISA para la detección de *X. fastidiosa*

| No. Bacteria | Insecto | Tejido de aislamiento | Resultado¹ |
|---------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 262 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cabeza sin desinfestar | Negativo |
| 264 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cabeza sin desinfestar | Negativo |
| 4170 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4171 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4172 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4173 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4165 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |
| 4174 | <i>Apogonalia</i> spp. | Cuerpo sin desinfestar | Negativo |

¹Negativo = Resultado negativo en la detección de *X. fastidiosa*; Positivo = Resultado positivo en la detección de *X. fastidiosa*.

Anexo 11. Listado de bacterias de las venas y pecíolo de hojas de plantas de café *Coffea arabica*.

| No | Localidad | No. Planta | Morfología de la colonia ¹ | | | | | Frec ² | | Pruebas ³ | | | | Morfología celular ⁴ | | |
|------|-----------------------|------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------|---------|----|-------------------|-----|----------------------|------|-------|------|---------------------------------|------|--|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | Frec | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Baci. | Esp. | |
| 4373 | Villa cecilia (Yauco) | 11 | crema | Redonda con margen elevado | Entero | elevada | 7 | 1 | + | - | + | + | | X | | |
| 4374 | Villa cecilia (Yauco) | 5 | Amarillo | Irregular - dispersa | Ondulado | Plana | 17 | 2 | + | - | - | + | | X | | |
| 4375 | Villa cecilia (Yauco) | 3 | Amarillo | Filiforme | Ondulado | Plana | 38 | 1 | + | - | + | + | | X | | |
| 4376 | Villa cecilia (Yauco) | 13 | Amarillo | Arrugada | Ondulado | Plana | 12 | 2 | - | + | + | + | | X | | |
| 4377 | Villa cecilia (Yauco) | 12 | Crema | Concéntrica | Ondulado | Plana | 18 | 1 | + | - | + | + | X | | | |
| 4378 | Sierra Alta (Yauco) | 11 | Blanco | Forma L | Ondulado | Elevada | 10 | 3 | - | + | - | + | X | | | |
| 4379 | Sierra Alta (Yauco) | 15 | Blanco | Filiforme | Ondulado | Elevada | 8 | 1 | - | + | - | + | | X | | |
| 4380 | Villa cecilia (Yauco) | 1 | Amarillo | Redonda con margen escalonado | Lobado | Plana | 21 | 1 | - | + | - | + | | X | | |
| 4381 | Sierra Alta (Yauco) | 3 | Amarillo | Redonda | Entero | convexa | 2 | 95 | + | - | + | + | | X | | |
| 4382 | Sierra Alta (Yauco) | 12 | Blanco | Concéntrica | Entero | Plana | 5 | 5 | + | - | - | + | | X | | |
| 4383 | Villa cecilia (Yauco) | 8 | Blanco | Concéntrica | Entero | Plana | 5 | 30 | + | - | - | + | X | | | |
| 4384 | Villa cecilia (Yauco) | 6 | Blanco | Filiforme | Lobado | Elevada | 5 | 5 | + | - | - | + | | X | | |
| 4385 | Sierra Alta (Yauco) | 15 | Blanco | Filiforme | Ondulado | Elevada | 8 | 1 | + | - | - | + | | X | | |
| 4386 | Sierra Alta (Yauco) | 11 | Amarillo | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Plana | 15 | 6 | - | + | - | + | | X | | |
| 4387 | Sierra Alta (Yauco) | 11 | Amarillo | Arrugada | Lobado | Plana | 10 | 5 | + | - | + | + | | X | | |
| 4388 | Villa cecilia (Yauco) | 8 | Amarillo | Arrugada | Ondulado | Elevada | 7 | 1 | - | + | - | + | | X | | |
| 4389 | Sierra Alta (Yauco) | 14 | Amarillo | Arrugada | Ondulado | Plana | 9 | 7 | + | - | - | + | | X | | |
| 4390 | Villa cecilia (Yauco) | 9 | Amarillo | Filiforme | Ondulado | Elevada | 5 | 4 | + | - | - | + | | X | | |
| 4391 | Villa cecilia (Yauco) | 9 | Amarillo | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Plana | 8 | 83 | + | - | - | + | | X | | |
| 4392 | Villa cecilia (Yauco) | 2 | Amarillo | Irregular and disperso | Lobado | Plana | 50 | 1 | - | + | - | + | X | | | |
| 4393 | Villa cecilia (Yauco) | 12 | Blanco | Filiforme | Lobado | Plana | 13 | 2 | - | + | - | + | X | | | |
| 4394 | Villa cecilia (Yauco) | 11 | Amarillo | Filiforme | Ondulado | Plana | 14 | 3 | - | + | - | + | | X | | |
| 4395 | Villa cecilia (Yauco) | 2 | Amarillo | Arrugada | Lobado | Plana | 15 | 9 | + | - | + | + | | X | | |
| 4396 | Villa cecilia (Yauco) | 3 | Amarillo | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Elevada | 12 | 15 | + | - | + | + | | X | | |
| 4397 | Villa cecilia (Yauco) | 5 | Blanco | Redonda | Entero | Elevada | 7 | 2 | - | + | + | + | | X | X | |

Anexo 11. (Cont...) Listado de bacterias de las venas y peciolo de hojas de plantas de café *Coffea arabica*.

| No | Localidad | No. Planta | Morfología de la colonia ¹ | | | | | Frec ² | Pruebas ³ | | | | Morfología celular ⁴ | | |
|------|-----------------------|------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------|---------|----|-------------------|----------------------|-----|------|------|---------------------------------|------|-------|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | Frec | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Baci. |
| 4398 | Villa cecilia (Yauco) | 7 | Crema | Irregular - dispersa | Ondulado | Plana | 29 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4399 | Villa cecilia (Yauco) | 7 | Rosa | Redonda | Entero | Convexa | 5 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4400 | Villa cecilia (Yauco) | 8 | Crema | Redonda con margen escalonado | Lobado | Elevada | 11 | 7 | - | + | - | + | | X | X |
| 4401 | Villa cecilia (Yauco) | 11 | Crema | Irregular - dispersa | Lobado | Elevada | 26 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4403 | Villa cecilia (Yauco) | 13 | Crema | Concéntrica | Ondulado | Elevada | 9 | 7 | + | - | - | + | | X | |
| 4404 | Villa cecilia (Yauco) | 15 | Amarillo | Redonda | Ondulado | Plana | 6 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4405 | Sierra Alta (Yauco) | 4 | Amarillo | Arrugada | Ciliado | Plana | 9 | 2 | + | - | - | - | | X | |
| 4406 | Sierra Alta (Yauco) | 13 | Amarillo | Arrugada | Ondulado | Elevada | 16 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4407 | Sierra Alta (Yauco) | 13 | Crema | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Plana | 12 | 2 | + | - | - | + | | X | |
| 4408 | Juana Díaz | 5 | Blanco | Irregular – dispersa | Ondulado | Plana | 7 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4409 | Juana Díaz | 5 | Crema | Concéntrica | Ondulado | Elevada | 11 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4010 | Juana Díaz | 4 | Blanco | Concéntrica | Ondulado | Plana | 7 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4011 | Juana Díaz | 4 | Amarillo | Compleja | Ondulado | Elevada | 20 | 1 | + | - | + | - | | X | |
| 4012 | Juana Díaz | 7 | Blanco | Forma L | Ondulado | Plana | 6 | 2 | + | - | - | + | X | | |
| 4013 | Juana Díaz | 9 | Amarillo | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Elevada | 23 | 1 | + | - | - | + | X | | |
| 4014 | Juana Díaz | 15 | Crema | Filiforme | Ondulado | Plana | 21 | 1 | + | - | - | + | X | | |
| 4015 | Juana Díaz | 1 | Rosa | Forma L | Elevada | Entero | 6 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4016 | Juana Díaz | 1 | Blanco | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Plana | 10 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4017 | Juana Díaz | 3 | Crema | Irregular – dispersa | Ondulado | Plana | 28 | 1 | + | - | - | - | | X | |
| 4018 | Juana Díaz | 6 | Naranja | Compleja | Ondulado | Elevada | 6 | 5 | + | - | + | + | | X | |
| 4019 | Juana Díaz | 8 | Blanco | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Elevada | 5 | 8 | - | + | - | + | | X | X |
| 4020 | Juana Díaz | 11 | Rosa | Filiforme | Ondulado | Elevada | 8 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4021 | Juana Díaz | 14 | Blanco | Redonda con margen elevado | Entero | Elevada | 4 | 2 | - | + | - | + | X | | |
| 4022 | Juana Díaz | 15 | Blanco | Arrugada | Ondulado | Elevada | 7 | 3 | + | - | + | + | | X | |

Anexo 11. (Cont...) Listado de bacterias de las venas y peciolo de hojas de plantas de café *Coffea arabica*.

| No | Localidad | No. Planta | Morfología de la colonia ¹ | | | | | Frec ² | Pruebas ³ | | | | Morfología celular ⁴ | | |
|------|------------|------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------|---------|----|-------------------|----------------------|-----|------|------|---------------------------------|------|-------|
| | | | Color | Conf | Mar. | Eleva | mm | | Frec | KOH | Gram | Oxid | Cata. | Coco | Baci. |
| 4024 | Juana Díaz | 11 | Blanco | Redonda con margen elevado | Lobado | Plana | 9 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4025 | Adjuntas | 15 | CRECE | SOBRE | TODA | CAJA | | | - | + | + | + | | X | |
| 4026 | Adjuntas | 3 | Blanco | Redonda con margen elevado | Entero | Elevada | 6 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4027 | Adjuntas | 4 | Blanco | Filiforme | Ondulado | Plana | 15 | 1 | - | + | - | + | X | | |
| 4028 | Adjuntas | 4 | Rosa | Redonda | Entero | Convexa | 3 | 2 | +? | - | - | + | X | | |
| 4029 | Adjuntas | 7 | Amarillo | Irregular - disperso | Ondulado | Elevada | 25 | 1 | + | - | + | + | | X | |
| 4030 | Adjuntas | 15 | Rosa | Forma L | Entero | Plana | 7 | 1 | - | + | + | + | | X | |
| 4031 | Adjuntas | 15 | Amarillo | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Elevada | 9 | 1 | - | + | + | + | X | | |
| 4032 | Adjuntas | 20 | Crema | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Plana | 9 | 2 | + | - | + | + | | X | X |
| 4033 | Adjuntas | 29 | Crema | Compleja | Lobado | Plana | 11 | 1 | + | - | - | + | | X | |
| 4034 | Adjuntas | 32 | Blanco | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Elevada | 5 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4035 | Adjuntas | 34 | Crema | Rizoide | Ondulado | Elevada | 8 | 2 | - | + | - | + | | X | |
| 4036 | Adjuntas | 36 | Amarilla | Redonda con margen escalonado | Ondulado | Elevada | 8 | 15 | - | + | + | + | X | | |
| 4037 | Adjuntas | 38 | Crema | Irregular and disperso | Ondulado | Plana | 18 | 1 | + | - | + | + | X | | |
| 4038 | Adjuntas | 39 | Blanco | Concéntrica | Lobado | Plana | 15 | 2 | - | + | + | + | | X | |
| 4039 | Adjuntas | 41 | Blanca | Redonda | Entero | Elevada | 13 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4040 | Adjuntas | 41 | Amarillo | Forma L | Ondulado | Plana | 10 | 1 | - | + | - | + | | X | |
| 4041 | Adjuntas | 45 | Amarillo | Arrugada | Lobado | Elevada | 9 | 1 | - | + | + | - | X | | |

¹ Morfología de la colonia: Color = color de la colonia; Conf = configuración; Mar = Margén; Elev = Elevación; mm = Diámetro en milímetros.

² Frec: Frecuencia de aislamiento.

³ Pruebas: KOH = Prueba de KOH; Gram = Tinción diferencial; Oxid = Oxidasa; Cata. = Catalasa.

⁴ Morfología celular: Coco = Células en forma de coco; Bac = Células en forma de bacilo; Esp = Presencia de esporas.

⁵ + = Resultado positivo; - = Resultado negativo.

Anexo 12. Grupos de bacterias con características comunes (color colonia, morfología celular, respuesta Gram, Oxidasa y Catalasa) aisladas de venas y peciolo de hojas.

| No. Grupo | Frec ¹ | Color colonia | Morfología celular | Gram ² | Oxidasa | Catalasa |
|-----------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------|----------|
| 1 | 6 | Amarillo | Bacilo sin esporas | + | - | + |
| 2 | 3 | Rosa | Bacilos sin esporas | + | + | + |
| 3 | 14 | Blanco | Bacilo con espora | + | | + |
| 4 | 3 | Crema | Bacilos con esporas | - | + | + |
| 5 | 3 | Blanco o Amarillo | Cocos | - | + | + |
| 6 | 3 | Amarillo | Bacilo sin esporas | + | + | + |
| 7 | 6 | Crema | Bacilos | - | - | + |
| 8 | 11 | Blanco | Cocos sin esporas | + | + | + |
| 9 | 8 | Blanco o amarillo | Cocos sin esporas | + | - | + |
| 10 | 5 | Blanco | Cocos sin esporas | - | - | + |
| 11 | 4 | Amarilla | Bacilos | - | + | + |
| 12 | 2 | Blanco | Bacilo | - | - | + |

¹ Frec. : Frecuencia bacterias con iguales características.

² Gram: Tinción diferencial.

³ + = Positivo; - = Negativo.

Anexo 13. Identificación de bacterias aisladas de tejidos internos de plantas mediante el sistema BIOLOG®.

| No. Bacteria | Identificación | % Similaridad |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 4394 | <i>Arthrobacter sp.</i> | 39.6 |
| 4400 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 65.2 |
| 4032 | <i>Bacillus cereus</i> | 63.8 |
| 4397 | <i>Bacillus sp.</i> | 31.6 |
| 4019 | <i>Chryseobacterium</i> | 36.5 |
| 4376 | <i>Clavibacter michiganensis</i> | 56.2 |
| 4035 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 56.8 |
| 4382 | <i>Micrococcus luteus</i> | 70.2 |
| 4027 | <i>Staphylococcus delphini</i> | 68.6 |
| 4408 | <i>Staphylococcus chromogenus</i> | 63.2 |
| 4388 | <i>Rhizobium rhizogenes</i> | 76.8 |
| 4373 | <i>Sphingobacterium thalpophilum</i> | 65.9 |